



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

## REPORTE DE SERVICIO SOCIAL

**“Estandarización de técnicas moleculares para la  
detección de sistemas biosintéticos en  
actinobacterias”**

### PRESENTA

Minnel Guadalupe Hernández Abarca

**Matrícula: 2192051711**

**Asesor interno:** Nora Lidia Sánchez Saucedo

**No. Económico:** 18752

**Asesor externo:** Janette Berenice González Nava

**Cédula No.** 12744827. Laboratorio de Microbiología  
Médica y Ambiental, UAEMex

**Lugar de realización del proyecto:** Laboratorio de  
Producción de Biológicos, edificio N-202,  
UAM Xochimilco

**Fecha de inicio:** 29 julio 2022

**Fecha de término:** 31 enero 2023

## ÍNDICE

1. Introducción.....	4
2. Justificación.....	5
3. Objetivos.....	5
3.1 Objetivo general.....	5
3.2 Objetivos específicos.....	5
4. Marco teórico.....	6
4.1 Generalidades de actinobacterias.....	6
4.2 Actinomicetos.....	6
4.2.1 Identificación de actinomicetos.....	7
4.3 <i>Streptomyces</i> .....	8
4.4 Sistemas biosintéticos.....	10
4.4.1 Sistemas PKS I, PKS II.....	10
4.4.2 Sistemas NRPS.....	11
4.4.3 Ectoína.....	13
4.4.4 Nocobactina.....	14
4.5 Amplificación de sistemas biosintéticos.....	15
4.6 Electroforesis en gel de agarosa.....	16
4.7 Herramientas bioinformáticas.....	17
4.7.1 antiSMASH.....	18
4.7.2 BLAST.....	18
4.7.3 BioEdit.....	19
4.7.4 MEGA.....	20
4.8 Protocolo de búsqueda en antiSMASH.....	21
5. Metodología.....	24
5.1 Cepas de estudio.....	24
5.1.1 Siembra de cepas.....	25
5.2 Extracción de ADN.....	25
5.2.1 Extracción de ADN kit PROMEGA.....	25
5.3 Amplificación de sistemas biosintéticos.....	25

5.3.1	PKS I.....	26
5.3.2	PKS II.....	27
5.3.3	NRPS I.....	28
5.3.4	Ectoína A y C.....	29
5.4	Identificación de cepas.....	30
<b>6.</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
6.1	Resultados de amplificación de sistemas biosintéticos.....	32
6.2	Capacidad biosintética de cepas de estudio analizadas en antiSMASH.....	34
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>35</b>
<b>8.</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>36</b>
<b>9.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>40</b>
<b>10.</b>	<b>Firma de asesores.....</b>	<b>75</b>

## **1. Introducción**

Las actinobacterias o actinomicetos conforman un grupo ubicuo y heterogéneo de microorganismos Gram positivos, filamentosas y representan uno de los grupos más grandes entre los 18 linajes reconocidos dentro del dominio bacteria, es decir, entre el 20 y 60% de la población microbiana total del suelo. Estas bacterias están ampliamente distribuidas en hábitats terrestres, ambientes acuáticos de agua dulce y marinos. Prefieren los medios alcalinos y son considerados microorganismos saprófitos, ya que cumplen un importante rol en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo del carbono mediante la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas (1).

Este grupo es relevante en términos biotecnológicos y económicos, debido a que produce más de la mitad de los antibióticos (2).

La actividad metabólica y fisiológica de las actinobacterias las transforma en un grupo objetivo para biotecnología debido a su producción de enzimas extracelulares y la formación de una amplia variedad de metabolitos bioactivos que desempeñan un papel primordial en el mantenimiento, señalización y colonización de su hábitat (2). Es así como los miembros del género *Streptomyces* principalmente, son productores de la mayoría de los antibióticos de uso frecuente en clínica humana y/o animal (estreptomycin, tetraciclina, cloranfenicol, etc.) y una de las fuentes más ricas en productos naturales y agentes antitumorales, produciendo alrededor del 80% de todos los metabolitos secundarios bioactivos, los conocimientos genómicos recientes parecen afectar la explotación de estas bacterias metabólicamente versátiles en varios aspectos (3).

Dentro de los metabolitos secundarios con actividad antibiótica sintetizados por *Streptomyces* spp., se destaca un grupo de compuestos denominados policétidos y péptidos de síntesis no ribosomal, entre los cuales se encuentran sustancias de aplicación en medicina y biotecnología (1).

Producen moléculas que actúan como inmunosupresores. fitotoxinas, biopesticidas, biosurfactantes, nanopartículas, probióticos y enzimas involucradas en la degradación de polímeros complejos. Esta versatilidad de metabolitos hace de estas bacterias, importantes herramientas para aplicaciones en el área farmacéutica, médica, y biotecnológica como en biorremediación, biofertilizantes o en el control biológico de enfermedades de plantas de importancia agrícola (2).

## **2. Justificación**

Las actinobacterias, son microorganismos que participan activamente en la descomposición de la materia orgánica de los suelos, y su importancia radica en que algunas especies producen metabolitos bioactivos/secundarios empleados en el tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos y a su vez, utilizados en el área farmacológica. Estas bacterias contienen en su genoma, genes biosintéticos que son capaces de codificar productos naturales utilizados en la industria de alimentos, biotecnología, etc. (4). Por lo anterior, es importante conocer las técnicas moleculares necesarias para poder detectar sistemas biosintéticos en este tipo de bacterias y predecir la producción de metabolitos secundarios de interés farmacológico.

## **3. Objetivos**

### **3.1 General**

Estandarizar las técnicas moleculares para la detección de sistemas biosintéticos en actinobacterias.

### **3.2 Específicos**

1. Desarrollar protocolos de los procedimientos para la detección de sistemas biosintéticos
2. Describir genes biosintéticos en actinobacterias.

## **4. Marco teórico**

### **4.1 Generalidades de actinobacterias**

Las actinobacterias, también conocidas como actinomicetos, son un grupo de bacterias Gram positivas, cuya composición de G+C es de 63 a 78% guanina más citosina (G + C), encontrándose en el extremo superior de este límite con el porcentaje de G + C más alto que cualquier otra bacteria. (5). Sus células se elongan y tienen la capacidad de formar un micelio filamentososo ramificado, pueden producir esporas y algunas de ellas también pueden formar un micelio aéreo. La proporción y la magnitud de la elongación de los filamentos (hifas) con ramificaciones laterales, dependen de la cepa, del medio de crecimiento y de la temperatura de incubación. Se les ha llegado a comparar con los hongos debido a que comparten semejanzas respecto al ciclo de vida de dicho grupo. Sin embargo, en la pared celular de las actinobacterias se observa la presencia de peptidoglicano y el micelio formado por éstas es mucho más delgado que el de los hongos, características que establecen la diferencia entre ambos tipos de microorganismos (6).

Por otro lado, los actinomicetos son considerados microorganismos saprófitos, es decir, obtienen su energía de materia orgánica muerta o en putrefacción y por tal motivo, cumplen un importante rol en la descomposición de la materia orgánica y el ciclo del carbono mediante la producción de diversas enzimas hidrolíticas y ligninolíticas. Así mismo, representan entre el 20 y 60% de la población microbiana total del suelo, pero también pueden encontrarse en ambientes acuáticos tanto dulces como marinos (1).

### **4.2 Actinomicetos**

Los actinomicetos son bacterias filamentosas que se encuentran ampliamente distribuidas en el medio ambiente, son microorganismos con propiedades quitinolíticas, alto contenido de guanina y citosina en su DNA, característica que los hace morfológicamente diversos entre sí y ayuda a diferenciarlos de otras bacterias Gram positivas. (7). Debido a su amplia distribución, se pueden encontrar en

superficies rocosas y en suelo rizosférico, ricos en humus, hojarasca y estiércol, sedimentos marinos. La mayoría de las especies son heterótrofas, aerobios, mesófilas, crecen en un rango de temperatura entre 25°C y 30°C y son poco tolerantes a la acidez, razón por la cual requieren pH neutro para su óptimo crecimiento, aunque crecen en un rango de pH entre 5.0 y 9.0. A pesar de las condiciones de crecimiento establecidas de manera general en la literatura, los actinomicetos son microorganismos que se adaptan a otro tipo de condiciones (7).

#### **4.2.1 Identificación de actinomicetos**

El estudio de la morfología de los actinomicetos sigue siendo difícil, y hoy en día su diagnóstico y clasificación se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo, además en pruebas bioquímicas y moleculares (7).

El estudio de la morfología de los actinomicetos sigue siendo difícil, y hoy en día su diagnóstico y clasificación se basa principalmente en las características macroscópicas y microscópicas del microorganismo, como por ejemplo en la forma de la colonia, la estructura y tamaño del micelio aéreo, su fragmentación en formas cocoides, bacilares, presencia de espirales y bucles, ramificación, fragmentación y disposición de las pseudohifas y la presencia y contenido de esporas. Además, en pruebas bioquímicas y metabólicas, se basa en la presencia de los micelios en el sustrato, la formación de pigmentos solubles, el uso de fuentes de carbono, movilidad, sensibilidad a determinados antibióticos, propiedades proteolíticas, presencia de oxidasas, reductasas o el uso de compuestos nitrogenados, así como también, el uso de técnicas moleculares para la caracterización de actinobacterias (7).

Sin embargo, la identificación y caracterización de los actinomicetos ha avanzado, ya que se basaba únicamente en características morfológicas y fisiológicas para lograr su clasificación. Actualmente para establecer la adecuada caracterización de estos microorganismos y lograr identificar el género e incluso especie, es necesario el uso de herramientas como la microscopia de luz para determinar cada uno de los

aspectos descritos anteriormente, además estudios fisiológicos, determinar el tipo de peptidoglicano, realizar pruebas de correlación de la composición de la pared celular y a nivel molecular, mediante el análisis del contenido y relación de guanina-citosina presente en el ADN. Principalmente, las técnicas moleculares han aportado al avance en la clasificación bacteriana en la actualidad y los diferentes métodos de clasificación han surgido debido a la gran variedad dentro de la familia *Actinomycetaceae*, especialmente dentro del género *Streptomyces*, el cual difiere mucho en su morfología, fisiología, bioquímica y actividades como productores de antibióticos. El género *Streptomyces* que se compone de un gran número de especies, ha presentado problemas en cuanto a su clasificación, ya que no se ha establecido un único método para llegar a su identificación. Por esta razón, es importante establecer parámetros definidos en cuanto a la caracterización morfológica y fisiológica, de los actinomicetos como la estructura y fragmentación del micelio, formación de estructuras de reproducción, crecimiento en diferentes medios de cultivo, entre otros (7).

### **4.3 *Streptomyces***

Este género ha recibido particular atención por tres principales motivos; primero, se encuentra en abundancia en el suelo y juega un importante rol en el ciclo del carbono, puede hidrolizar un amplio rango de polisacáridos (celulosa, quitina y xilano) y otras macromoléculas naturales, esta acción es por la producción de diversas exoenzimas hidrolíticas; segundo, el género exhibe amplia extensión filogenética, representado por más de 500 especies identificadas; y tercero, producen una diversidad de metabolitos secundarios bioactivos, así, son los más interesantes para la industria y la medicina (8).

Cuando la secuencia del genoma de *S.coelicolor* fue publicado se observó que tiene un gran potencial para producir metabolitos secundarios, ya que fueron identificados 18 clusters genéticos biosintéticos para producirlos, incluyendo uno que surgió para la producción de antibióticos policétidos crípticos (9). Algunas cepas de *Streptomyces* albergan más de 50 clusters genéticos para metabolitos secundarios.



Esto ha sugerido una extensiva investigación en genómica aplicada en los antibióticos críticos y métodos para la activación de su biosíntesis (10).

Estas bacterias crecen en la superficie de medios simples o complejos (medios de Sabouraud, Bennett, Lowenstein-Jensen), formando filamentos ramificados (hifas) aéreas, que poseen cadenas de conidias que no se fragmentan. Sólo *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* y *Nocardiosis* forman micelios aéreos en los cultivos.

Así mismo, los cultivos muestran su crecimiento entre dos a diez días, cultivados a temperatura de 37°C o, aún mejor, a 30°C. Las colonias presentan aspecto ceroso, de aspecto polvoroso, de color blanco grisáceo, común en la mayoría de los *Streptomyces*, variando del color crema al negro, como sucede con *S. somaliensis*; sin embargo, estos aspectos no son específicos, y dependen de las condiciones de cultivo (11).

Las especies *S.pelletieri*, *S.griseus*, *S.lanatus* y *S.albus* son patógenas, aislados de pacientes inmunocomprometidos, principalmente con alguna patología pulmonar, aunque este género tiene mayor relevancia biotecnológica, debe conocerse su patogenicidad para diagnosticar y dar tratamiento eficaz.

Con el paso de los años, se han creado diversos métodos que han contribuido a la identificación de vías de señalización en la producción de compuestos y a la exploración de un extenso conjunto de genes para mejorar la producción de bacterias. Además, se han creado métodos moleculares basados en secuencias bacterianas para lograr la identificación filogenética de microorganismos desconocidos, como por ejemplo, la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de genes vinculados al metabolismo secundario (sistemas PKS y NRPS), que incluye la amplificación de secuencias específicas de genes ribosomales o el análisis y restricción de los productos de ADN recombinante, son técnicas empleadas para evaluar la capacidad de un microorganismo para producir metabolitos bioactivos con alguna actividad farmacológica (12).

Por tal motivo, la importancia de estandarizar las técnicas moleculares para la detección de genes que codifican moléculas con capacidad farmacológica radica en

poder tener procedimientos estandarizados de trabajo en el laboratorio y que estos sean reproducibles por cualquier persona.

#### **4.4 Sistemas biosintéticos**

Se conoce como sistemas biosintéticos a un conjunto de genes que codifican a estructuras químicas y que al unirse forman una molécula con probable actividad biológica (13).

La producción de compuestos bioactivos en diversos microorganismos se debe especialmente a la presencia de los sistemas modulares policétido sintasa (PKS) y sintetasa de péptido no ribosomal (NRPS) dentro de su genoma. Estos sistemas multifuncionales, son sintetizados por grupos de genes codificados para un número variable de módulos (compuestos por 1,000-1,500 aminoácidos) con actividades enzimáticas encontrados principalmente en *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, *Sphingobacteria* y *Actinobacteria* (12).

##### **4.4.1 Sistemas PKS I, PKS II**

Los sistemas biosintéticos policétido sintasa (PKS) son sistemas multifuncionales expresados por un grupo de genes, producen la mayoría de las moléculas bioactivas, que al igual que NRPS, codifican para módulos con múltiples actividades enzimáticas con características muy similares (13).

Los policétidos representan otro grupo importante de productos naturales, muchos de los cuales también se sintetizan en enzimas multimodulares llamadas policétido sintasas de tipo I (PKS) (14).

Los PKS forman tres grupos dependiendo su secuencia, estructura primaria y mecanismo catalítico (13):

- PKS tipo I: Tiene un mecanismo similar a la síntesis de ácidos grasos (FAS), responsable de producir una gran cantidad de metabolitos.
- PKS tipo II: Responsable de producir compuestos aromáticos bacterianos y fúngicos, contiene enzimas que forman homodímeros y su único sitio activo

cataliza la unión de sustrato, la elongación de la cadena y la ciclación de las reacciones para formar policétidos.

- PKS tipo III: Están presentes en bacterias e incluso en hongos, las enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos tienen mayor diversidad funcional (13).

En analogía estructural y funcional, los módulos del sistema PKS contienen cuatro dominios bases catalíticos, algunos de los cuales son esenciales y otros opcionales para el alargamiento de la cadena, cada módulo PKS es responsable de la incorporación de una unidad de acetato o propionato en la cadena cétida en crecimiento (14). Estos módulos también comprenden la formación de policétidos, estos tres dominios básicos son acil-transferasa (AT), cetosintasa (KS) y un dominio de proteína transportadora de grupos acilo (ACP), con un dominio de liberación tioesterasa (Te), y, en algunos casos pueden contener dominios auxiliares, ceto-reductasa (KR), deshidratasa (DH), enoil-reductasa (ER) y metil-transferasa (MT) (13).

#### **4.4.2 Sistemas NRPS**

Las péptidos sintetetasas no ribosómicas (NRPS) son una gran familia de enzimas biosintéticas que generan productos naturales de relevancia medicinal a partir de precursores de aminoácidos. A diferencia de los péptidos y proteínas generados por el ribosoma, los NRPS incorporan aminoácidos en su maquinaria biosintética para elongación en metabolitos peptídicos secundarios. Los NRPS se clasifican frecuentemente en tipo I y tipo II según las diferencias en la arquitectura general de las sintetetasas (15).

Los NRPS de tipo I son grandes complejos modulares que contienen todas las enzimas necesarias para generar un producto peptídico en una línea de ensamblaje análoga a las sintetasas de ácidos grasos (FAS) y policétido sintetasas (PKS) de tipo I. Las proteínas NRPS tipo II son comúnmente enzimas independientes o dominios que se coordinan para formar derivados de aminoácidos únicos y también son vías lineales y no iterativas que contienen enzimas de adaptación especializadas y se

combinan con otras vías para generar un producto final. Las enzimas de adaptación se incluyen en los sistemas NRPS de tipo I y II; sin embargo, las enzimas de adaptación de tipo II a menudo proporcionan una diversificación adicional poco común en los sistemas de tipo I, como la deshidrogenación, la ciclopropanación o la migración de grupos funcionales (15).

Existen tres tipos de NRPS que dependen del tipo de biosíntesis que producen (13):

- NRPS tipo A lineal. El número y secuencia de los módulos es co-lineal al número y orden de los aminoácidos en el péptido.
- NRPS tipo B iterativos. Los módulos y dominios son usados más de una vez para sintetizar el péptido, lo cual, consiste en varias secuencias.
- NRPS tipo C no lineal. Genera péptidos en los cuales la secuencia de los aminoácidos no está correlacionada al acomodo de los módulos (13).

Por otro lado, los sistemas NRPS son compuestos por un grupo de genes que codifican para módulos con actividades enzimáticas, cada módulo está formado por 1,000-1,100 aminoácidos de largo y están compuestos por dominios responsables de la incorporación de una unidad monomérica del péptido (13).

La composición de cada módulo está constituida por tres dominios catalíticos que son necesario para un completo ciclo de elongación en la síntesis de péptidos catalizados por un NRPS (12).

- Adenilación (A): responsable del reconocimiento y activación del aminoácido relacionado al ácido hidroxilo.
- Acarreador-peptidil (PCP): actúa después que el sustrato es activado para transferencia y activación del acarreador-peptidil del mismo módulo.
- Condensación (C): responsable de la formación del enlace carbono-nitrógeno entre la cadena larga y el aminoácido activado (Alonso, Carmona., 2017).

### 4.4.3 Ectoína

La ectoína, ácido 1,4,5,6- tetrahidro-2-metil-4-pirimidina carboxílico y su derivado hidroxilado, 5-hidroxiectoína son dos de los osmolitos más comúnmente encontrados en el género *Streptomyces*. Además de su función osmoprotectora, estos solutos compatibles afectan la estabilidad y el correcto plegamiento de proteínas y protegen biomoléculas como enzimas y ácidos nucleicos en condiciones de estrés (16). Por esta razón, los *Streptomyces* suelen producir ectoínas como solutos compatibles para prevenir el estrés osmótico (16).

El derivado hidroxilado de la ectoína, hidroxiectoína, ha sido un objetivo de interés económico, debido a sus características biológicas específicas, que lo diferencian de otros solutos compatibles. Por lo tanto, se han descrito ya varios procesos para producirla de manera eficiente (17).

Las rutas de biosíntesis de la ectoína y la hidroxiectoína se han dilucidado en muchos microorganismos y generalmente ocurren en cuatro pasos enzimáticos.

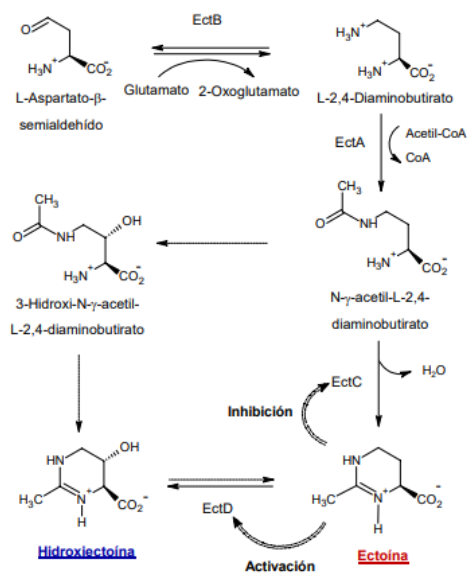


Figura 1. Ruta de biosíntesis de ectoína e hidroxiectoína (17).

En primer lugar, el L-Aspartato-β-semialdehído se convierte en L-2,4-Diaminobutirato (ácido diaminobutírico) mediante la diaminobutirato transaminasa

(EctB), que posteriormente se acetila a N-γ-acetil-L-2,4-diaminobutirato mediante la diaminobutirato acetil transferasa (EctA). La condensación cíclica de este compuesto por la ectoína sintasa (EctC) conduce a la formación de ectoína. La hidroxietoína se sintetiza mediante hidroxilación de ectoína por la ectoína hidroxilasa (proteína EctD) (16).

Las enzimas biosintéticas de ectoína y su derivado hidroxietoína están codificadas por un grupo de genes evolutivamente altamente conservados (16).

#### 4.4.4 Nocobactina

La nocobactina NA es producida por *Nocardia asteroides* ATCC 3313 (actualmente renombrado *Nocardia farcinica* ATCC 3313) y es una mezcla compuesta principalmente por dos variantes con cadenas laterales de nonilo y undecilo, correspondientes a 10152A y 10152B, respectivamente. La estructura de la nocobactina NA ha sido determinada por Ratledge y Snow (18), pero aún no se ha determinado su configuración absoluta (19).

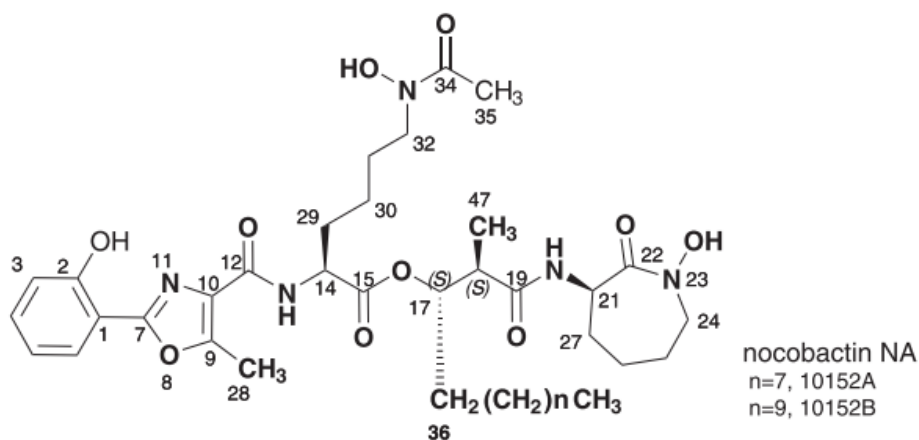


Figura 2. Estructura de nocobactina NA de *Nocardia farcinica* (19).

La nocobactina NA se compone de hidroxibenzoato, metiloxazolina, N-hidroxi-N-acetil-lisina, una cadena de acilo graso, y restos de N-hidroxi-ε-caprolactama (19).

a ruta de biosíntesis de la nocobactina NA, se inicia cargando salicilato que es sintetizado a partir de corismato por NbtS y activado por NbtT, en el dominio ArCP de NbtF. A continuación, NbtF activa y cicla la treonina, produciendo 2-hidroxifenil-(5-metiloxazolina) (ácido asteroídico). Posteriormente, se produce la condensación con lisina y una larga cadena de acilo graso con NbtD. A continuación, la epimerización y la condensación de la lisina son catalizadas por la NbtE. La fracción  $\epsilon$ -capro-lactama terminal se genera por la lactamización intramolecular de la lisina, lo que da lugar a la liberación del producto de las enzimas. Sin embargo, no está claro cuándo NbtG y NbtH desempeñan sus funciones en la biosíntesis de nocobactina NA (19).

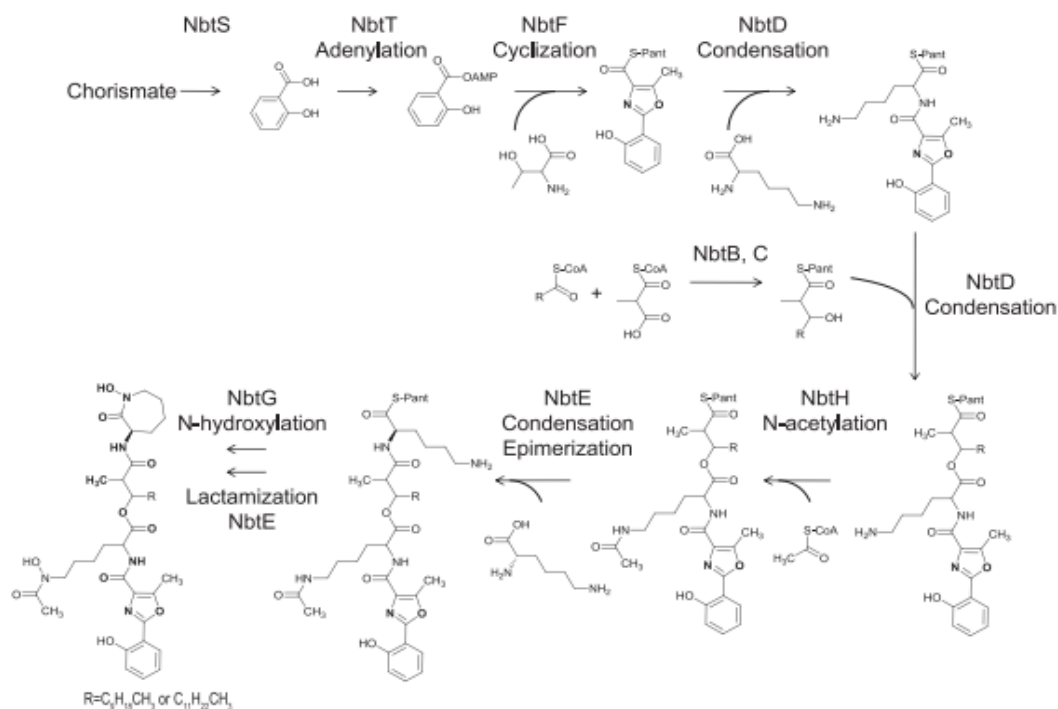


Figura 3. Ruta biosintética de nocobactina NA (19).

#### 4.5 Amplificación de sistemas biosintéticos

La amplificación de sistemas biosintéticos (clusters) es necesaria para conocer si las actinobacterias serán capaces de producir productos bioactivos, se lleva a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual es una reacción enzimática *in vitro* llevada a cabo por la DNA polimerasa en donde

mediante una catálisis realiza copias de una secuencia blanco de DNA (o ARN) con el objetivo de amplificar millones de veces un fragmento específico de dicho material genético para que pueda ser posteriormente analizado con diferentes fines (20).

Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales son equipos designados para PCR y están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo sean las adecuadas para cada uno de los ciclos. Cada ciclo de PCR consta básicamente de tres etapas: desnaturalización, hibridación y extensión (20).

#### **4.6 Electroforesis en gel de agarosa**

Al final de la PCR, para corroborar si la reacción transcurrió de manera eficiente, o bien, si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la reacción o también llamados amplicones son analizados a través de una electroforesis en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (20).

La electroforesis consiste en separar grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funge como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo con su tamaño y carga eléctrica, esta separación se hace bajo un buffer o tampón llamado TAE (Tris-Acetato-EDTA) (20).

Para ello, se prepara un gel diluyendo una cantidad específica de agarosa, que generalmente es al 1% en el buffer y, dependiendo el tamaño de las moléculas puede ser hasta al 2%, se calienta hasta que la agarosa hierva lo suficiente y quede una mezcla totalmente homogénea, se añade EtBr (Bromuro de etidio) que funge como un aclarador de ácidos nucleicos, y posteriormente se vacía a un recipiente que sirve de base para que solidifique (20).

El EtBr (Bromuro de etidio) al ser capaz de unirse al ADN de doble cadena, cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas, es importante manipular este compuesto adecuadamente ya que es mutagénico y teratógeno (20).



Finalmente, cuando los amplicones vayan a ser corridos en el gel, deben cargarse junto con un marcador de peso molecular que contenga un número determinado de segmentos de ADN conocidos, para facilitar la identificación de los amplicones y verificar si su tamaño, que está dado por el número de pares de bases (pb), corresponde con el esperado. Una vez cargados y corridos en el gel, son expuestos a la luz UV (20).

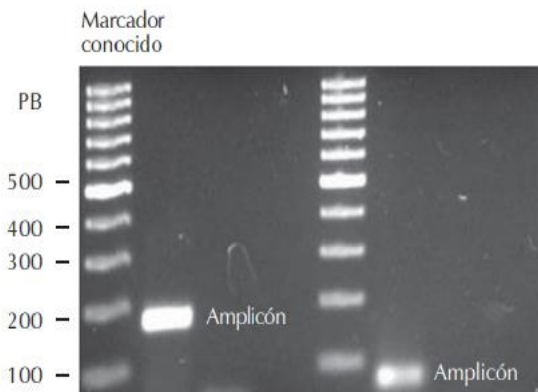


Figura 4. Amplicón en gel de agarosa expuesto a luz UV (20).

#### 4.7 Herramientas bioinformáticas

Desde que se secuenciaron los primeros genomas bacterianos, ha aumentado el interés por descubrir nuevos productos naturales, lo que ha llevado a muchos investigadores a desarrollar técnicas de biología molecular y herramientas bioinformáticas (13).

Las herramientas bioinformáticas han demostrado obtener mejoras en la investigación en áreas afines, comparan miles de genes y genomas enteros para predecir estructuras moleculares, también permiten caracterizar fácilmente un genoma bacteriano, encontrando y definiendo los genes que presenta y que podrían ser responsables de su patogenicidad (21).

Estas herramientas han mejorado la calidad de los análisis genómicos en muy poco tiempo. Suelen utilizar cortes seleccionados para identificar genes o dominios con precisión en un grupo de secuencias alineadas para detectar vías biosintéticas (13).

#### **4.7.1 antiSMASH**

Se conocen muchas vías biosintéticas y la fiabilidad de las predicciones es alta en programas bioinformáticos como el Antibiotics and Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH), capaz de identificar loci biosintéticos que cubren toda la gama de clases conocidas de compuestos de metabolitos secundarios (policétidos, péptidos no ribosómicos, terpenos, aminoglucósidos, aminocumarinas, indolocarbazoles, lantibióticos, bacteriocinas, nucleósidos, betalactámicos, butirolactonas, sideróforos, melaninas y otros). Alinea las regiones identificadas a nivel de grupo de genes con sus parientes más cercanos a partir de una base de datos que contiene todos los demás grupos de genes conocidos, e integra o entrecruza todos los métodos de análisis de genes específicos de metabolitos secundarios previamente disponibles en una vista interactiva (22).

Para ello, se seleccionaron las cepas de interés y se buscaron en NCBI (The National Center for Biotechnology Information) las claves de las cepas tipo que tenían el genoma completo cromosómico. Una vez identificado el microorganismo, la secuencia de referencia o “RefSeq” de cada cepa, se copió en el antiSMASH para conocer las regiones del genoma que contienen uno o varios tipos de sistemas biosintéticos o metabolitos bioactivos, que son capaces de producir algún metabolito y se eligieron aquellos de interés.

#### **4.7.2 BLAST**

Por otro lado, la comparación de secuencias es una de las actividades fundamentales en el análisis bioinformático. Es un primer paso hacia el análisis estructural y funcional de nuevas secuencias descubiertas (23).

El Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), es el algoritmo más empleado por el NCBI, y es utilizado habitualmente para comparar o hacer coincidir una secuencia dada contra toda una base de datos de millones de secuencias que produce alineamientos locales por pares entre cada pareja de secuencias y genera un valor de significación estadística para cada alineamiento, mostrando una cierta similitud (24).

BLAST, realiza búsquedas en una base de datos no redundante (nr) la cual tiene los registros no redundantes entre las dos bases de datos principales a nivel

mundial: GenBank en USA y EMBL (European Molecular Biology Laboratories) en Europa (25).

Esta comparación se realizó copiando la secuencia de la cepa de interés en BLAST, de la página de NCBI, y se eligieron los microorganismos que tenían el genoma completo (no parcial), siempre y cuando tuvieran especie, clave de una cepa tipo y el porcentaje de similitud fuera mayor a 95% respecto a la secuencia de referencia. Así mismo, se seleccionó el número de acceso del microorganismo y se verificó que en NCBI existiera algún artículo o artículos publicados de la secuenciación del genoma de esa especie y cepa en específico.

### **4.7.3 BioEdit**

A medida que nuevas secuencias están siendo generadas a tasas exponenciales, la importancia de la comparación de secuencias ha aumentado considerablemente. En términos simples, el alineamiento de secuencias es el proceso en el cual diferentes secuencias son comparadas mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de correspondencias residuo-residuo entre secuencias relacionadas. El alineamiento de secuencias consiste en la comparación de dos secuencias homólogas para localizar las inserciones, deleciones o cambios puntuales en los nucleótidos que se hayan podido producir en el proceso de divergencia de ambas desde el ancestro común (23).

BioEdit es un programa para edición de alineamientos y análisis de secuencias biológicas que funciona únicamente sobre MS/Windows. Es uno de los programas más conocidos para edición de secuencias para dicho sistema operativo, cuenta con varias herramientas que van desde la creación de alineamientos hasta la anotación de plásmidos (23).

Se hizo uso del paquete computacional BioEdit, y de secuencias de material genético de las especies de interés, utilizando un archivo guardado en formato FASTA. Para un mejor análisis se abrieron directamente las secuencias forward “f” y reverse “r”, junto con los cromatogramas, una vez exportadas todas las secuencias de interés, se seleccionó toda la secuencia “r” o “f”, se eligió la opción Sequence->Nucleic Acid->Reverse complement, se copió la secuencia y se pegó junto con la

secuencia a comparar, posteriormente, se hizo una secuencia contig-0, se seleccionaron ambas secuencias y en el comando Accessory Application, se eligieron todas las opciones del cuadro de diálogo y se corrió el análisis, el resultado fueron todas las secuencias alineadas y estas se guardaron para su posterior análisis.

#### **4.7.4 MEGA**

De la misma manera, otra herramienta bioinformática conocida es MEGA (Análisis de genética evolutiva molecular), la cual es una herramienta integrada para la alineación de secuencias automática y manual, infiriendo árboles filogenéticos, extrayendo bases de datos basadas en la web, estimando tasas de evolución molecular y probando hipótesis evolutivas (26).

Un árbol filogenético es una representación esquemática de entidades biológicas que están conectadas por descendencia común, pueden ser especies o grupos taxonómicos mayores. Hoy en día, la mayoría de los árboles filogenéticos se crean a partir de datos moleculares ya sea ADN, ARN o proteínas. Se tiende a usar ADN cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, porque proveen más información (27).

El árbol contiene varios componentes. Se encuentran los nodos terminales o puntas, que representan las Unidades Taxonómicas Operativas (OTUS) o taxones, estas pueden ser individuos de una especie o grupos taxonómicos mayores. Cada uno de estos nodos terminales se encuentran unidos mediante ramas a un nodo interno, el cual representa al ancestro común entre los nodos terminales, de tal manera que los nodos terminales representan el presente, mientras que los nodos internos representan el pasado (27).

La importancia de un árbol filogenético yace en la topología, es decir, cómo están unidas las ramas o el patrón de ramificación, lo que representa la relación evolutiva entre los distintos taxones. En el caso de la figura 5, a los taxones A y B, se les denomina taxones hermanos, ya que comparten un reciente ancestro común, y que no lo comparten con otro. Al taxón F, se le denomina "outgroup", que se encuentra emparentado más lejanamente a los otros taxones, llamados "ingroup". Los outgroups sirven para enraizar el árbol, es decir para indicar el comienzo del

proceso de ramificación, señalando así el nodo más interno compartido por todos, la raíz (27).

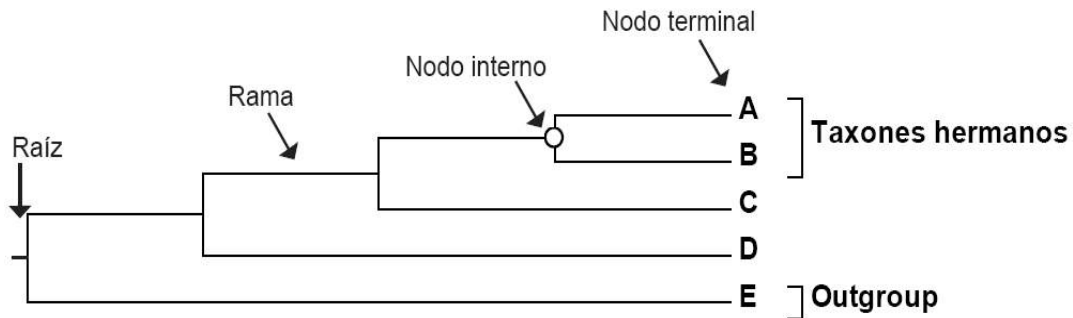
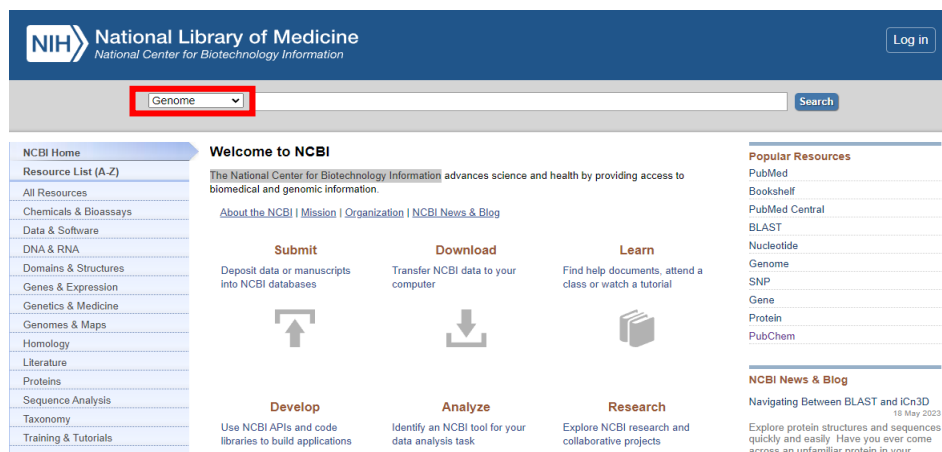


Figura 5. Anatomía de un árbol filogenético (27).

#### 4.8 Protocolo de búsqueda en antiSMASH

- Seleccionar el nombre de un microorganismo (Utilizar el nombre del microorganismo con especie a la que se le tiene que buscar el genoma completo, por ejemplo, “*Streptomyces sampsonii*”) y buscar en NCBI (The National Center for Biotechnology Information) la clave de la cepa que tenga el genoma completo.

Link: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, filtrar la búsqueda únicamente en “Genome”



- Seleccionar “*Genome assemblies*: (depende de cuantos genomas completos o incompletos tenga ese microorganismo) (See *Genome Assembly and*

Annotation report) para identificar a las cepas que tengan el genoma completo, se escogerá aquella cepa que tenga el “Assembly level” completo, por ejemplo:

Genome > **Genome Information by Organism**

**Streptomyces sampsonii**

Organism name (common or scientific) or Accession (Assembly, BioProject or n   Download Reports from FTP site

Organism Overview: **Genome Assembly and Annotation report (2)**

#	Organism Name	Organism Groups	Strain	BioSample	BioProjec	Assembly	Lev	Size	GC%	Replicons
1	Streptomyces sampsonii	Bacteria; Terrabacteria group; Actinomycetota	KJ40	SAMN04338613	PRJNA336086	GCA_001704195.1	●	7.07	73.40	chromosome: NZ_CP016824.1/CP016824.1
2	Streptomyces sampsonii	Bacteria; Terrabacteria group; Actinomycetota	KJ40	SAMN04338613	PRJNA305966	GCA_001865315.1	●	7.26	73.30	

Si el nivel de ensamblaje o el assembly level) está a la mitad, con un tercio o tres cuartos, no se selecciona esa cepa porque el genoma no está completo.

- Seleccionar el nombre del microorganismo e identificar lo siguiente:

Organism Overview: **Streptomyces sampsonii**  
Streptomyces sampsonii KJ40 genome sequencing and assembly

Lineage: Bacteria[32424]; Actinomycetota[4565]; Actinomycetes[4144]; Kitasatosporales[695]; Streptomyocetales[693]; Streptomyces[633]; Streptomyces altidoflavus group[4]; Streptomyces sampsonii[1]

**Summary**

Submitter: Sichuan Agricultural University  
**Assembly level: Complete Genome**  
 Assembly: GCA\_001704195.1\_ASM170419v1 scaffolds: 1 contigs: 1 N50: 7,070,328 L50: 1  
 BioProjects: PRJNA336086  
 Statistics: total length (Mb): 7.07033  
 protein count: 9539  
 GC%: 73.4

**Genome Neighbors**

Closest genome: Streptomyces sampsonii Symmetrical identity: 98.2503%  
 Genome Group: 1 genomes at symmetrical identity 98% (See Genome Neighbor report)

**Replicon Info**

Type	Name	RefSeq	INSDC	Size (Mb)	GC%	Protein	rRNA	tRNA	Other RNA	Gene	Pseudogene
Chr	NZ_CP016824.1		CP016824.1	7.07	73.4	6,929	21	87	3	6,151	121

**Genome Region**

Streptomyces sampsonii strain KJ40 chromosome\_complete\_genome

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

Tools:

Genes:

Para verificar que el genoma está completo.

Para conocer la procedencia/relevancia de esa cepa (Agrícola, médica, etc.)

La secuencia de referencia o “RefSeq” se copia en el *antisMASH* para conocer las regiones del genoma que contienen los sistemas biosintéticos/metabolitos.

La cepa se elige siempre y cuando:

- El *tipo* de genoma esté completo y sea cromosómico y **NO de plásmido**.
- De preferencia la clave de la cepa sea de una **cepa tipo** o de una cepa ya conocida, trabajada o publicada, por ejemplo: ATCC, NBRC, CCM etc.

(Colecciones de cepas: <https://lpsn.dsmz.de/text/collections>)

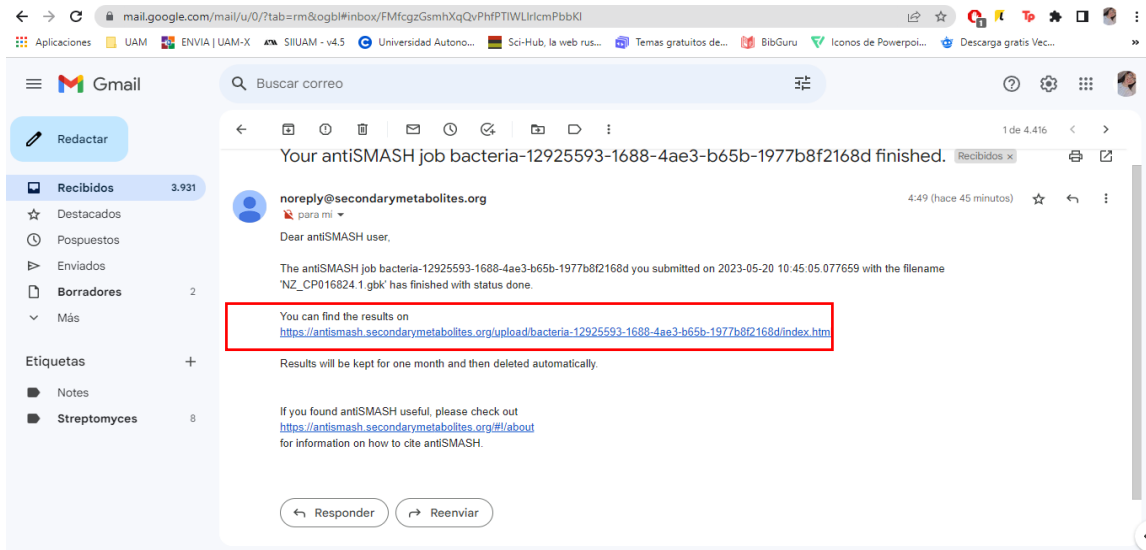
- Una vez abierto el antiSMASH, proporcionar un correo electrónico al cual se mandarían los resultados automáticamente y también se debe colocar la secuencia

de referencia o “RefSeq” de la cepa elegida y seleccionar “Submit” para iniciar la búsqueda.

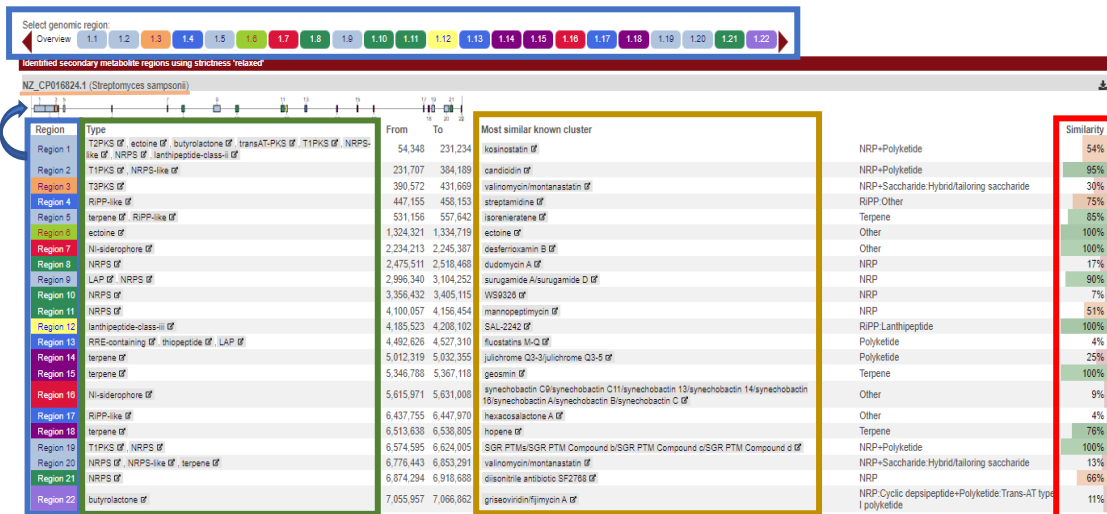
Link: <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>, filtrar en “bacterial version”

The screenshot shows the antiSMASH web interface. The browser address bar displays [antismash.secondarymetabolites.org/#!/start](https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start). The page title is "antiSMASH bacterial version". The interface includes a sidebar with server status (working), running jobs (1), queued jobs (0), and jobs processed (154824). The main form is titled "Nucleotide input" and "Results for existing job". It contains a search bar, notification settings (email: minne90@gmail.com), data input (upload file or Get from NCBI with accession number NZ\_CP016824.1), detection strictness (relaxed), and extra features (All off). A "Submit" button is at the bottom.

- El correo con los resultados proporcionará lo siguiente:



Abrir el link para conocer las regiones del genoma de la cepa del microorganismo elegido que contienen uno o varios tipos de sistemas biosintéticos que son capaces de producir algún metabolito y seleccionar o elegir los de nuestro interés.



Los resultados en ese link estarán activos/disponibles únicamente por un mes y después serán eliminados automáticamente.

## 5. Metodología

### 5.1 Cepas de estudio

Se utilizaron 63 cepas de actinobacterias del género *Streptomyces* previamente identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA estudiadas en un trabajo anterior a este. Estas cepas se eligieron por su potencial biosintético.

Por otra parte, utilizando antiSMASH, se identificaron todos los sistemas presentes en cada especie de las cepas estudiadas para determinar si alguna era adecuada para su uso como control positivo. Sin este análisis, no se podría confirmar la validez del método empleado, ni se podría descartar la posibilidad de que la cepa no amplifique el gen de interés. Por tal motivo, la búsqueda de un control positivo resultaba fundamental para la estandarización de la técnica para amplificaciones de genes biosintéticos.



Se utilizó *Streptomyces sampsonii* como control positivo para el sistema PKS II, se obtuvo el número de referencia en NCBI el cual fue utilizado para buscar en antiSMASH las regiones codificantes de genes biosintéticos y así saber si la especie contenía los genes de interés PKS, NRPS y Ectoína, ya que cada bacteria conocida (con clave de cepa tipo), tiene en su genoma regiones diferentes que contienen un tipo o tipos de sistemas biosintéticos capaces de producir metabolitos de interés (químico, farmacéutico, biológico, etc.) como antibióticos, antifúngicos, anticancerígenos.

### **5.1.1 Siembra de cepas**

Las cepas de estudio se sembraron en placas de Petri de agar Malta y Bennett y se incubaron a 37°C en aireación hasta su crecimiento.

## **5.2 Extracción de ADN**

### **5.2.1 Extracción de ADN kit PROMEGA**

Se utilizó el método Chelex-100, el cual consiste en:

1. Se resuspendieron las colonias en 200 µL de agua estéril libre de nucleasas (Mili Q) y 60 µL de Chelex con perlas de vidrio.
2. Se agitó en vórtex por dos minutos.
3. Se incubó por 30 minutos a 100°C.
4. Se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm.
5. Después, se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.5 ml estéril.
6. Y finalmente, se cuantificó el ADN extraído en espectrofotómetro y se almacenó a -20°C. hasta su utilización para la amplificación.

## **5.3 Amplificación de sistemas biosintéticos**

Para la estandarización de los sistemas PKS I, PKS II, NRPS I, Ectoína A, Ectoína C, se utilizó la Taq DNA Polymerase Recombinant (Marca Invitrogen, cat. 10342-020) y los primers correspondientes para cada sistema, con las siguientes condiciones de amplificación.

### 5.3.1 PKS I

Los primers utilizados para la amplificación del sistema PKS I, fueron (28):

- Primer F: K1f (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3')
- Primer R: M6r (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3')

En donde el tamaño del gen es de 1100-1200 pb.

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de amplificación de sistema PKS I.	
<b>PKS I</b>	
H <sub>2</sub> O Mili Q	15.75 µL
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.75 µL
cATP	0.2 µL
dGTP	0.2 µL
dCTP	0.2 µL
dTTP	0.2 µL
Primer F ( <b>K1f</b> )	1 µL
Primer R ( <b>M6r</b> )	1 µL
Taq polimerasa	0.2 µL
ADN	3 µL
<b>Total:</b>	25 µL

Para amplificar el sistema biosintético PKS-I se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: 5 minutos a 95°C para predesnaturalizar, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturalizar, 2 minutos a 58°C para alineación del primer y 4 minutos a 72°C para la extensión, y un paso final de 10 minutos a 72°C para la extensión final. Para observar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, a 100V por 30 minutos, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

### 5.3.2 PKS II

Para el sistema PKS II, los primers utilizados fueron (29):

- Primer F: Ks  $\alpha$  (5'-TSGRCTACRTCAACGGSCACGG-3')
- Primer R: Ks  $\beta$  (5'-TACSAGTCSWTCGCCTGGTTC-3')

En donde el tamaño del gen es de 1000 pb.

<b>Tabla 2.</b> Condiciones de amplificación del sistema PKS II.	
<b>PKS II</b>	
H <sub>2</sub> O Mili Q	16.25 $\mu$ L
Buffer	2.5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	0.75 $\mu$ L
cATP	0.2 $\mu$ L
dGTP	0.2 $\mu$ L
dCTP	0.2 $\mu$ L
dTTP	0.2 $\mu$ L
Primer F ( <b>KS <math>\alpha</math></b> )	1.0 $\mu$ L
Primer R ( <b>KS <math>\beta</math></b> )	1.0 $\mu$ L
Taq polimerasa	0.2 $\mu$ L
ADN	2.5 $\mu$ L
<b>Total:</b>	25 $\mu$ L

Para amplificar el sistema biosintético PKS-II se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: 5 minutos a 95°C para predesnaturalizar, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturalizar, 2 minutos a 58°C para alineación del primer y 4 minutos a 72°C para la extensión, y un paso final de 10 minutos a 72°C para la extensión final. Para observar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, a 100V por 30 minutos, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

### 5.3.3 NRPS I

En el caso del sistema NRPS I, los primers utilizados fueron (28):

- Primer F: A3f (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3')
- Primer R: A7r (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')

En donde el tamaño del gen es de 700-800 pb.

<b>Tabla 3. Condiciones de amplificación del sistema NRPS I.</b>	
<b>NRPS I</b>	
H <sub>2</sub> O Mili Q	16.25 µL
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.75 µL
cATP	0.2 µL
dGTP	0.2 µL
dCTP	0.2 µL
dTTP	0.2 µL
Primer F ( <b>A3f</b> )	1.0 µL
Primer R ( <b>A7r</b> )	1.0 µL
Taq polimerasa	0.2 µL
ADN	2.5 µL
<b>Total:</b>	25 µL

Para amplificar el sistema biosintético NRPS-I se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: 5 minutos a 95°C para predesnaturalizar, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C para desnaturalizar, 2 minutos a 58°C para alineación del primer y 4 minutos a 72°C para la extensión, y un paso final de 10 minutos a 72°C para la extensión final. Para observar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, a 100V por 30 minutos, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

### 5.3.4 Ectoína A y C

Para Ectoína A, los primers utilizados fueron (30):

- Primer F: FwEctA (5'-GCTTACGCACCCGTCAAATC-3')
- Primer R: RwEctA (5'-GGTCCGATGCGGTACAGGAC-3')

En donde el tamaño del gen es de 633 pb.

<b>Tabla 4. Condiciones de amplificación de Ectoína "A".</b>	
<b>ECTOÍNA "A"</b>	
H <sub>2</sub> O Mili Q	14.8 µL
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.8 µL
cATP	0.4 µL
dGTP	0.4 µL
dCTP	0.4 µL
dTTP	0.4 µL
Primer F ( <b>EctA</b> )	1.0 µL
Primer R ( <b>EctA</b> )	1.0 µL
Taq polimerasa	0.3 µL
ADN	3.0 µL
<b>Total:</b>	25 µL

Y para Ectoína C, los primers utilizados fueron (30):

- Primer F: FwEctC (5'-CGCAAACCGTGATCGTCCG-3')
- Primer R: RwEctC (5'-GGTGA CT CACACCTCCTCGG-3')

En donde el tamaño del gen es de 414 pb.

<b>Tabla 5. Condiciones de amplificación de Ectoína "C".</b>	
<b>ECTOÍNA "C"</b>	
H <sub>2</sub> O Mili Q	14.8 µL
Buffer	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.8 µL

cATP	0.4 µL
dGTP	0.4 µL
dCTP	0.4 µL
dTTP	0.4 µL
Primer F ( <b>EctC</b> )	1.0 µL
Primer R ( <b>EctC</b> )	1.0 µL
Taq polimerasa	0.3 µL
ADN	3.0 µL
<b>Total:</b>	<b>25 µL</b>

Para amplificar los sistemas biosintéticos Ectoína A y C se utilizaron las siguientes condiciones en el termociclador: 3 minutos a 95°C para predesnaturalizar, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturalizar, 1 minuto a 55°C para alineación del primer y 2 minutos a 72°C para la extensión, y un paso final de 7 minutos a 72°C para la extensión final. Para observar el producto de la amplificación se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, a 100V por 30 minutos, y se utilizó un marcador de peso molecular de 100pb.

#### 5.4 Identificación de cepas

El análisis del 16S rRNA es una técnica comúnmente empleada en microbiología para la identificación y clasificación de bacterias. Al estudiar estas cepas (Tabla 6) cuya identidad se estableció previamente mediante este análisis, se secuenció su ARN ribosomal 16S y se comparó con bases de datos de referencia para determinar su identidad taxonómica.

<b>Tabla 6.</b> Identificación de las cepas de estudio	
<b>Clave de la cepa</b>	<b>Especie</b>
<b>9.212</b>	<i>S. thermodiastaticus</i>
<b>9.04</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>9.170</b>	<i>S. fimicarius</i>
<b>9.216</b>	<i>S. phaeochromogenes</i>
<b>9.252</b>	<i>S. labedae</i>
<b>9.209</b>	<i>S. globisporus</i>
<b>9.180</b>	<i>S. albus</i>

<b>9.230</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>9.32.2</b>	<i>S. violaceochromogenes</i>
<b>9.238</b>	<i>S. cinereoruber</i>
<b>9.187</b>	<i>S. olivaceus</i>
<b>9.157</b>	<i>S. flavovirens</i>
<b>9.163</b>	<i>S. globisporus</i>
<b>9.44</b>	<i>S. viridosporus</i>
<b>11.84</b>	<i>S. chartreusis</i>
<b>11.183</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>11.107</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>12.103</b>	<i>S. koyangensis</i>
<b>12.119</b>	<i>S. carpaticus</i>
<b>12.129</b>	<i>S. fimicarius</i>
<b>12.168</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>12.93</b>	<i>S. lividans</i>
<b>13.46</b>	<i>S. chartreusis</i>
<b>13.103</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>13.183</b>	<i>S. olivaceus</i>
<b>13.204</b>	<i>S. fimicarius</i>
<b>14.126</b>	<i>S. thermodiastaticus</i>
<b>14.162</b>	<i>S. thermodiastaticus</i>
<b>14.221</b>	<i>S. violaceochromogenes</i>
<b>14.277</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>14.56</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>14.90</b>	<i>S. thermodiastaticus</i>
<b>15.188</b>	<i>S. albus</i>
<b>15.257</b>	<i>S. parvulus</i>
<b>15.268</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>16.285</b>	<i>S. koyangensis</i>
<b>16.81</b>	<i>S. fimicarius</i>
<b>34.30</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>39.031</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>4505</b>	<i>S. koyangensis</i>
<b>6279</b>	<i>S. sampsonii</i>
<b>7220040</b>	<i>S. thermodiastaticus</i>

## 6. Resultados

### 6.1 Resultados de amplificación de sistemas biosintéticos

Las cepas cuya identidad se ha confirmado previamente mediante análisis y comparación de su secuencia genética con bases de datos de referencia, fungen como controles positivos. Estos controles positivos sirven como puntos de referencia confiables para validar nuestros procedimientos y asegurar la precisión de nuestras técnicas de identificación.

Por otro lado, las muestras de comprobación son aquellas cuya identidad aún no ha sido confirmada. Estas muestras se someten a los mismos procedimientos de análisis, pero su identidad taxonómica aún no se ha establecido. La comparación de los resultados obtenidos con las muestras de comprobación con los de nuestros controles positivos, permite evaluar la eficacia y la precisión de los métodos de identificación y amplificación.

Clave de la cepa	Especie	PKS I	PKS II	NRPS I	Ectoína A	Ectoína C
9.212	<i>S. thermodiastaticus</i>	-	-	+	-	+
9.04	<i>S. sampsonii</i>	-	-	-	-	-
9.170	<i>S. fimicarius</i>	+	-	+	+	+
9.250	-	-	+	-	-	-
9.216	<i>S. phaeochromogenes</i>	-	-	+	-	+
9.252	<i>S. labedae</i>	+	-	+	-	+
9.209	<i>S. globisporus</i>	-	-	+	-	+
9.180	<i>S. albus</i>	-	-	+	-	+
9.178	-	-	+	+	-	+
9.188	-	-	+	+	-	+
9.230	<i>S. sampsonii</i>	-	+	+	-	+
9.179	-	-	+	+	-	+
9.32.2	<i>S. violaceochromogenes</i>	+	-	+	-	+
9.123	-	-	-	+	-	+
9.238	<i>S. cinereoruber</i>	-	-	-	-	-
9.187	<i>S. olivaceus</i>	-	-	+	-	+
9.157	<i>S. flavovirens</i>	-	-	+	-	-



9.163	<i>S. globisporus</i>	+	-	+	-	+
9.44	<i>S. viridosporus</i>	-	-	-	-	+
11.84	<i>S. chartreusis</i>	-	-	-	-	-
11.183	<i>S. sampsonii</i>	+	+	+	+	-
11.107	<i>S. sampsonii</i>	-	-	-	-	-
11.90	-	-	-	-	-	+
11.26	-	-	-	-	-	-
11.51	-	-	-	+	-	+
12.103	<i>S. koyangensis</i>	-	-	+	-	-
12.113	-	-	-	+	-	-
12.119	<i>S. carpaticus</i>	-	-	+	-	-
12.129	<i>S. fimicarius</i>	-	-	+	-	-
12.135	-	-	-	+	-	-
12.66	-	-	-	-	-	-
12.167	-	-	-	-	-	-
12.168	<i>S. sampsonii</i>	+	-	+	<b>Control negativo</b>	<b>Control negativo</b>
12.93	<i>S. lividans</i>	-	-	-	-	-
12.196	-	-	-	-	-	-
13.46	<i>S. chartreusis</i>	-	-	+	-	+
13.103	<i>S. sampsonii</i>	-	+	+	+	+
13.120	-	-	-	-	-	+
13.163	-	-	-	-	-	-
13.174	-	-	-	-	-	+
13.183	<i>S. olivaceus</i>	+	-	+	-	+
13.204	<i>S. fimicarius</i>	-	+	<b>Control positivo</b>	+	+
14.118	-	-	+	+	-	+
14.126	<i>S. thermodiastaticus</i>	-	-	+	-	+
14.162	<i>S. thermodiastaticus</i>	+	-	+	<b>Control positivo</b>	<b>Control positivo</b>
14.209	-	-	-	-	-	+
14.221	<i>S. violaceochromogenes</i>	-	-	+	-	+
14.277	<i>S. sampsonii</i>	-	-	+	-	+
14.56	<i>S. sampsonii</i>	-	<b>Control negativo</b>	+	-	-
14.90	<i>S. thermodiastaticus</i>	-	-	+	-	+
15.188	<i>S. albus</i>	-	-	-	-	-
15.257	<i>S. parvulus</i>	-	-	+	-	+
15.268	<i>S. sampsonii</i>	-	-	<b>Control negativo</b>	-	-

16.202	-	-	-	+	-	+
16.285	<i>S. koyangensis</i>	-	-	-	-	-
16.279	-	-	-	-	-	+
16.81	<i>S. fimicarius</i>	-	-	+	-	+
34.30	<i>S. sampsonii</i>	+	+	+	+	-
39.031	<i>S. sampsonii</i>	+	+	+	+	+
4505	<i>S. koyangensis</i>	-	-	+	-	+
6279	<i>S. sampsonii</i>	+	<b>Control positivo</b>	+	+	+
7220040	<i>S. thermodiastaticus</i>	-	-	-	-	+
92766	-	-	-	+	-	-

## 6.2 Capacidad biosintética de cepas de estudio analizadas en antiSMASH

Las cepas que no poseen genomas completos no son adecuadas para ser utilizadas como controles en estudios microbiológicos, ya que la ausencia de esta información genética impide conocer su capacidad biosintética y otros rasgos relevantes para su identificación y caracterización. Sin embargo, esta misma carencia las convierte en excelentes candidatas para ser utilizadas como cepas de estudio en investigaciones dirigidas a comprender su potencial biológico y realizar estudios posteriores (Anexo A).

De todas las especies que se analizaron en antiSMASH, con ayuda del número de referencia obtenido de NCBI, *Streptomyces sampsonii* (6279) funcionó como control positivo para los sistemas PKS I y PKS II (Anexo B y C) ya que en la base de datos se encontró que esta especie tenía el gen codificante que se buscaba y así poder estandarizar la técnica de amplificación, de la misma manera, *Streptomyces fimicarius* (13.204) se utilizó como control positivo para NRPS I (Anexo D), y *Streptomyces thermodiastaticus* (14.162) resultó ser control positivo para Ectoína A y Ectoína C (Anexo E y F).

## 7. Conclusiones

Al realizarse un análisis de 63 cepas de actinobacterias del género *Streptomyces* previamente identificadas por secuenciación del gen 16S rRNA para evaluar su potencial biosintético, utilizando la herramienta antiSMASH, se identificaron los sistemas biosintéticos presentes en cada cepa para seleccionar aquellas adecuadas como controles positivos en la amplificación de genes biosintéticos específicos. *Streptomyces sampsonii* fue seleccionado como control positivo para el sistema PKS II, *Streptomyces fimicarius* para NRPS I, y *Streptomyces thermodiastaticus* para Ectoína A y Ectoína C, debido a la presencia de los genes de interés en sus genomas.

El uso de estos controles positivos fue crucial para la validación y estandarización de las técnicas de identificación y amplificación de genes biosintéticos, garantizando la precisión y confiabilidad del método. Las cepas con identidades confirmadas por análisis 16S rRNA funcionaron como referencias seguras, mientras que las cepas sin genomas completos, aunque no aptas como controles, representan valiosas oportunidades de investigación para explorar su potencial biológico.

Este enfoque integral asegura la correcta identificación y caracterización de las cepas, permitiendo avanzar en la comprensión y utilización de sus capacidades biosintéticas para aplicaciones químicas, farmacéuticas y biológicas.

## **8. Referencias bibliográficas**

1. Parada R., Marguet E., Vallejo M. Aislamiento y caracterización parcial de actinomicetos de suelos con actividad antimicrobiana contra bacterias multidrogo-resistentes. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 2017; 19 (2): 15-23. [En línea] Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/776/77654661003.pdf>
2. Barrientos L., Lamilla C., Santos A., Actinobacterias fuente inagotable de recursos biotecnológicos. CEMT. 2017. [En línea] Disponible en: <https://www.med.ufro.cl/cemt/index.php/noticias/56-actinobacterias-fuente-inagotable-de-recursos-biotecnologicos>
3. Polpass J., Anjisha., Bhavanath J. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *ELSEVIER*, 246. 2021. [En línea] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501321000148?via%3Dihub>
4. Evangelista, Z., Quiñones, E. & Rincón, G. Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *TEMAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA*. 2017; 21(63), 39-51.
5. Becerril A. Actinobacterias aisladas del sedimento marino del Golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, bioactividad y dominios cetosintetasa. S.I.: Universidad Autónoma de Baja California. 2011.
6. Reyes A., Rincón G., Evangelista Z., Quiñones E., & López L. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria (rdu)*. 2015; 16 (11): 1-15. [En línea]: <https://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/art92.pdf>
7. González Jiménez, Y.T. Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal. [Trabajo de grado]. Universidad Javeriana. 2010.
8. Komaki H., Sakurai K., Hosoyama A., Kimura A., Igarashi Y., Tamura T., Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase

- gene clusters among taxonomically close *Streptomyces* strains. Scientific reports. 2018; 8(1): 6888.
9. Bentley S., Chater K., Cerdeno-Tarraga A., Challis G., Thomson N. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature. 2002;417: 141–147.
  10. Pawlik K., Kotowska M., Chater K., Kuczek K., Takano E. A cryptic type I polyketide synthase (cpk) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). Arch Microbiol. 2007; 187:87–99.
  11. Hidrin, N, Goodfellow, M, Boiron, P, Moreno, M, & Serrano, J. A. Los estreptomices: Actualización y revisión didáctica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 2001; 21(1), 36-38. [En línea] Disponible en: [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562001000100006&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000100006&lng=es&tlng=es).
  12. Alonso, Carmona, G. S. Identificación y caracterización de actinobacterias con presencia de los sistemas PKS y NRPS. [Tesis doctorado]. Toluca, Estado de México: Facultad de Enfermería y Obstetricia UAEM. 2017.
  13. González Nava, J. B. Detección de sistemas biosintéticos implicados en la producción de metabolitos secundarios en actinobacterias de origen clínico [Tesis doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de México. 2021.
  14. Schwarzer D, Marahiel MA. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*. 2001. 88(3):93-101. DOI: 10.1007/s001140100211. PMID: 11402845.
  15. García C. Identificación y caracterización de agrupaciones de genes de biosíntesis para péptidos no ribosomales en *Streptomyces sp.* CS113. 2018. Oviedo, España: Programa de Doctorado de Biología Molecular y Celular.
  16. Akram S., Bahram M., Mojtaba K., Gholamreza S., Hossein H., Majid S. Diversity of the ectoines biosynthesis genes in the salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. *Microbiological Research*, 2018. Volume 169, Issues 9–10, pages: 699-708, ISSN 0944-5013, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.005>.

17. Salar García, M. J. Desarrollo de procesos de producción de ectoínas en cultivos de alta densidad de *Chromohalobacter salexigens* DSM 3043. Murcia, España: Facultad de Química, Departamento de bioquímica y biología molecular e inmunología. 2011
18. Ratledge, C. y G. A. Snow. Aislamiento y estructura de nocobactina NA, un compuesto fijador de hierro soluble en lípidos de *Nocardia asteroides*. 1974. *Bioquímica. J.*139:407–413
19. Hoshino Y., Chiba K., Ishino K., Fukai T., Igarashi Y., Yazawa K., Mikami Y., Ishikawa J. Identification of nocobactin NA biosynthetic gene clusters in *Nocardia farcinica*. *J Bacteriol.* 2011 Jan;193(2):441-8. DOI: 10.1128/JB.00897-10. Epub 2010 Nov 19. PMID: 21097631; PMCID: PMC3019813.
20. Tamay de Dios L., Ibarra C., & Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013; 2(2): 70-78. [En línea] Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf>
21. Bioinformática para luchar frente a futuras pandemias bacterianas. DUPO - Diario de la Universidad Pablo de Olavide. 2022. [En línea] Disponible en: <https://www.upo.es/diario/ciencia/2022/04/bioinformatica-pandemias-bacterianas/>
22. Medema M., Blin K., Cimermancic P., de Jager V., Zakrzewski P., Fischbach M., Weber T., Takano E., Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jul;39(Web Server issue): W339-46. DOI: 10.1093/nar/gkr466. Epub 2011 Jun 14. PMID: 21672958; PMCID: PMC3125804.
23. Juárez, S. Alineamiento de secuencias de DNA Bioedit. *Scribd.* 2013. [En línea] Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/147681010/Alineamiento-de-Secuencias-de-Dna-Bioedit>

24. Búsqueda de secuencias en bases de datos — Bioinformatics at COMAV 0.1 documentation. 2010. [En línea] Disponible en: [https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro\\_bioinf/blast.html](https://bioinf.comav.upv.es/courses/intro_bioinf/blast.html)
25. EMBnet Colombia - Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología. 2024. [En línea] Disponible en: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/Blast/blast.php>
26. Admin, A. *MEGA 11 – Molecular Evolutionary Genetics Analysis – My Biosoftware – Bioinformatics Softwares* blog. 2021. [En línea] Disponible en: <https://mybiosoftware.com/mega-molecular-evolutionary-genetics-analysis.html>
27. Mendoza-Revilla, J. Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Médica Herediana*, 2012. 23(2), 119-127. [En línea] Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2012000200008&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2012000200008&lng=es&tlng=es).
28. Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol.* 2005 Jan; 49(1):10-24. DOI: 10.1007/s00248-004-0249-6.
29. González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, Genilloud O. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2005; 54:401-415. DOI: [10.1016/j.femsec.2005.05.004](https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.05.004)
30. Kol S., Merlo M., Scheltema R., Vries M., Vonk R., Kikkert N., Dijkhuizen L., Breitling R., Takano E. Metabolomic Characterization of the Salt Stress Response in *Streptomyces coelicolor*, *Applied and Environmental Microbiology* 76. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01992-09>

## 9. Anexos

### Anexo A. Tabla capacidad biosintética de cepas de estudio

Tabla 8. Capacidad biosintética de cepas de estudio ( <i>Elaboración propia</i> )						
Nombre m.o	Clave cepa	Procedencia /Relevancia	No. Metabolitos secundarios totales	Tipo de sistema biosintético	Nombre metabolito	Similitud
<i>Streptomyces sampsonii</i>	KJ40	Agrícola	22	T2PKS, ectoína, butirolactona, transAT-PKS, T1PKS, similar a NRPS, NRPS, lantipéptido-clase-ii	kosinostatina	54%
				T1PKS, similar a NRPS	candidicina	95%
				T3PKS	valinomicina/montanastatina	30%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	dudomicina	17%
				LAP, NRPS	surugamida A/surugamida D	90%
				NRPS	WS9326	7%
				NRPS	manopeptimicina	51%
				Lantipéptido-clase-iii	SAL-2242	100%
				T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM	100%



					Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	
				NRPS, similar a NRPS, terpeno	valinomicina/ montanastatina	13%
				NRPS	antibiótico diisonitrilo SF2768	66%
<i>Streptomyces coelicolor</i>	CFB_NBC_0001	Organismo modelo	26	hgIE-KS, T1PKS	A54145	3%
				NRP-metalóforo, NRPS	celichelín	100%
				T3PKS	falviolina/1,3,6,8-tetrahidroxina ftaleno	100%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b	87%
				T2PKS	actinorrodina	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	66%
				Similar a NRPS, T1PKS, prodigiosina	undecilprodigiosina	100%
				T1PKS, butirolactona	coelimicina P1	100%
				tioamida-NRP, NRPS	nogalamicina	40%
				Similar a PKS, T1PKS	policétido incendiario	96%

				T3PKS	germicidina	100%
				T3PKS, NRP- metalóforo, NRPS, terpeno	coelibactina	100%
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	W68	Agrícola	18	NRPS, similar a NRPS	WS9326	10%
				T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	100%
				Tiopéptido, LAP, que contiene RRE	fluostatinas MQ	4%
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				NRPS	decolorocurac omicina	16%
				NRPS	surugamida A/surugamid a D	95%
				ectoína	ectoína	100%
				T3PKS, T1PKS, similar a NRPS	canducidina	95%
				T1PKS, NRPS, lantipéptido-clase-ii, similar a NRPS	antimicina	100%
				<i>Streptomyces violascens</i>	YIM 10021 2	Ambiental
T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR	100%				

					PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	
				NRPS	ciclofaulknam icina	100%
				LAP	fluostatinas MQ	4%
				Lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				NRPS	manopeptimi cina	51%
				NRPS	WS9326	7%
				NRPS	surugamida A/surugamid a D	100%
				NRPS	dudomicina A	17%
				ectoína	ectoína	100%
				T3PKS	valinomicina/ montanastati na	34%
				T1PKS, similar a NRPS	candacidina	95%
				T1PKS, NRPS, lantipéptido-clase-ii, similar a NRPS	antimicina	100%
<i>Streptomyces albus</i>	DSM 40763	Industrial	26	Similar a NRPS, NRPS	enduracidina	8%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	75%
				T1PKS, similar a NRPS	ECO-0501	19%
				NRPS	dudomicina A	65%

				lantipéptido-clase-i, T1PKS, T2PKS	xantolipina	65%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS	ibomicina	78%
				NRPS	griseobactina	53%
				Similar a NRPS, T1PKS	meilingicina	13%
				T1PKS	guadinomina/ guadinomina B/ácido guadinómico	15%
				NRPS	coelibactina	54%
<i>Streptomyces koyangensis</i>	SCSI O 5802	Médico	20	NRPS, T1PKS	antimicina	100%
				T1PKS, similar a NRPS	candacidina	95%
				T3PKS	naringenina	100%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	WS9326	7%
				NRPS	manopeptimicina	22%
				T1PKS	neoabisomicina/abisomicina	78%
				NRPS, similar a NRPS, T1PKS	enduracidina	6%
T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	100%				

				NRPS, T1PKS, lantipéptido-clase-ii, lantipéptido-clase-iii	oxalimicina B	9%
<i>Streptomyces rutgersensis</i>	NBH7 7	Ambiental	22	NRPS, similar a NRPS	ikarugamicina	12%
				NRPS, T1PKS	antimicina	100%
				T1PKS, similar a NRPS	candidicina	95%
				T3PKS	naringenina	100%
				NRPS, T1PKS	isorenierateno	85%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	surugamida A/surugamicina D	85%
				NRPS	dechlorocuramicina	16%
				NRPS	WS9326	7%
				NRPS, similar a NRPS	cloranfenicol	17%
				T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	100%
				T1PKS, similar a NRPS	desoxihangtamicina	14%
				transAT-PKS, similar a NRPS, NRPS, similar a PKS	largiimicina 38/largimicina 39	54%

<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	ATCC 13740	SD	37	T1PKS	estreptamidina	100%
				NRPS, T1PKS, similar a NRPS	meilingicina	5%
				similar a NRPS	tetronasina	9%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS, T1PKS	rifamicina	9%
				NRPS	cada lado A/cada lado B	19%
				T2PKS	pigmento de esporas	75%
				T1PKS	estambomicina A/estambomicina B/estambomicina C/estambomicina D	16%
				T1PKS	tambjamina BE-18591	17%
				T2PKS, similar a NRPS	cosmomicina D	62%
				T3PKS	formicamicinas AM	16%
				PKS-like	yatakemicina	9%
				NRPS	celichelín	100%
				NRPS, transAT-PKS, similar a NRPS, T1PKS	intomicina B	100%
T1PKS	clorotricina/d esclorotricina	4%				

				T1PKS, NRPS, T3PKS	alquilresorcino l	100%
<i>Streptomyces glaucescens</i>	GLA. O	Industrial	25	similar a NRPS	acarviostatina I03/acarviostatina II03/acarviostatina III03, acarviostatina IV03	33%
				NRPS, similar a NRPS	tiazostatina/w atasemicina A/watasemicina B/2- hidroxifeniltiazolina enantioquinelina/isopioqu uelina	73%
				T1PKS	nataxazol	7%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS	tetracenomicina C	100%
				T2PKS	alociclinona	45%
				NRPS	ciclofaulknam icina	8%
<i>Streptomyces globisporus</i>	TFH5 6	Agrícola	27	T1PKS, NRPS	paulomicina	7%
				T3PKS	alquilresorcino l	100%
				T1PKS, NRPS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto	100%

					b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	
				T1PKS, NRPS, similar a NRPS	fosfinotricintri péptido	6%
				ectoína	showdomicin a	35%
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				T1PKS, similar a NRPS	enduracidina	8%
				lantipéptido-clase-iv	laberintopepti na A2/laberintop eptina A1/laberintop eptina A3	40%
				NRPS	albomicina delta2	100%
				ectoína	ectoína	100%
				T3PKS	lasalocida	9%
				NRPS	griseobactina	100%
				NRPS	clipibicyclene /azabicyclene B/azabicycle ne C/azabicycle ne D	16%
<i>Streptomyces cavourensis</i>	F2	SD	30	T2PKS	prejadomicin a/rabelomicin a/gaudimicin a C/gaudimicin	25%



					a D/UWM6/gau dimicina A	
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				similar a NRPS, NRPS	salinomicina	12%
				T1PKS	bafilomicina B1	100%
				T1PKS, NRPS	10-epi- HSAF/10-epi- 3-deOH- HSAF/10-epi- maltofilina/10 -epi- xanthobaccin C/10-epi- hidroximaltofi lina/10-epi- FI-2	100%
				NRPS	crochelína A	12%
				NRPS	valinomicina/ montanastati na	91%
				T3PKS	alquilresorcín ol	100%
				NRPS, T1PKS, similar a NRPS	lactazol	33%
				transAT-PKS, T1PKS, NRPS	griseobactina	100%
				NRPS	celichelín	81%
				T3PKS	naringenina	100%
				ectoína	ectoína	100%
		SD	37	NRPS, T1PKS	A-47934	8%

<i>Streptomyces griseus</i> <i>subsp. griseus</i>	NBRC 13350			NRPS, T3PKS	CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b	7%
				NRPS, similar a NRPS, T1PKS	lidamicina	41%
				NRPS, T1PKS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	100%
				NRPS, similar a NRPS	nucleocidina	47%
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				T1PKS, similar a NRPS	enduracidina	10%
				NRPS	atraticina	15%
				Similar a NRPS, NRPS	kitacinamicina a A/kitacinamicina B/kitacinamicina C/kitacinamicina D/kitacinamicina E/kitacinamicina F	61%

				similar a PKS	malacidina A/malacidina B	5%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS	griseoquelina	100%
				T1PKS	estambomici na A/estambomi cina B/estambomi cina C/estambomi cina D	40%
				T1PKS	iminimicina A/iminimicina B	100%
				T3PKS	naringenina	100%
				NRPS, transAT- PKS, T1PKS, similar a PKS, similar a NRPS	griseobactina	100%
<i>Streptomyces anulatus</i>	YINM 00001	SD	33	T1PKS, NRPS	balhimicina	8%
				Similar a NRPS, lantipéptido-clase-iv, transAT-PKS	cicloheximida	100%
				NRPS, T3PKS	CDA1b/CDA 2a/CDA2b/C DA3a/CDA3b /CDA4a/CDA 4b	7%
				NRPS, T1PKS	dutomicina	4%
				T1PKS	lidamicina	17%

				NRPS, T1PKS	SGR PTM/SGR PTM Compuesto b/SGR PTM Compuesto c/SGR PTM Compuesto d	100%
				NRPS, similar a NRPS	nucleocidina	47%
				T2PKS, NRPS	warkimicina CS1/warkimi cina CS2	97%
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				T1PKS, similar a NRPS	enduracidina	6%
				ectoína, NRPS, T1PKS	skyllamicina D/skylamicin a E	97%
				ectoína	ectoína	75%
				transAT-PKS	antramicina	73%
				lantipéptido-clase-ii, NRPS	estreptozotoc ina	19%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	colismicina A	7%
				T3PKS	naringenina	100%
				NRPS	retimicina A	13%
				NRPS	griseobactina	100%
<i>Streptomyces pratensis</i>	S10	SD	28	lantipéptido-clase-i	chejuenolida A/chejuenolid a B	7%
				similar a NRPS, NRPS, T1PKS	A33853	30%

				NRPS	depsibosamicina B/depsibosamicina C/depsibosamicina D	33%
				T1PKS	tripartilactama a/niizalactama C	96%
				T1PKS, similar a NRPS	quinolidomicona A	42%
				NRPS, T1PKS	coelibactina	100%
				T1PKS	venturicidina D/venturicidina a E/venturicidina a F/venturicidina A	57%
				transAT-PKS, similar a PKS, NRPS	dumulmicina/ shuangdaolida a A/shuangdaolida C/shuangdaolida B/shuangdaolida D	80%
				T2PKS	pigmento de esporas	83%
				T3PKS	tetronasina	11%
				T1PKS	hexacosalactona A	9%

				ectoína	ectoína	100%
				ectoína	ectoína	100%
				similar a NRPS, NRPS	OCS-2138	14%
				lantipéptido-clase-ii, lantipéptido-clase-iii	azalomicina F3a	8%
<i>Streptomyces microflavus</i>	DSM 40593	Organismo modelo	32	NRPS	clipibicyclene /azabicyclene B/azabicyclene C/azabicyclene D	16%
				transAT-PKS, T1PKS, NRPS	griseobactina	100%
				NRPS, T1PKS	celichelín	81%
				T3PKS	naringenina	100%
				ectoína	ectoína	100%
				similar a NRPS	botromicina A2	39%
				NRPS	ftoxazolina	4%
				T2PKS	prejadomicina a/rabelomicina a/audimicina a C/audimicina a D/UWM6/gaudimicina A	27%
				lantipéptido	keywimysin	100%
				T1PKS	argimicina PI/argimicina PII/nigrifactina a/argimicina	27%

					PIV/argimicin a PV/argimicin a PVI/argimicin a PIX	
				lantipéptido-clase-ii	AmfS	100%
				lantipéptido-clase-i	dehidroxinoc ardamina	28%
				similar a NRPS	indigoidina	17%
				similar a NRPS, NRPS	salinomicina	14%
				similar a NRPS	formicamicin as AM	11%
				T1PKS, NRPS	10-epi- HSAF/10-epi- 3-deOH- HSAF/10-epi- maltofilina/10 -epi- xanthobaccin C/10-epi- hidroximaltofi lina/10-epi- FI-2	100%
				NRPS	valinomicina/ montanastati na	56%
				T3PKS	alquilresorcini ol	100%
<i>Streptomyces collinus</i>	SQ	Industrial	25	T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-	100%

					tetrahidroxina ftaleno	
				T1PKS, hgIE-KS	hexacosalactona A	13%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS, similar a PKS, NRPS	aureonuclemicina	56%
				T2PKS	pigmento de esporas	83%
				NRPS	colibrimicina	21%
				T1PKS	tambjamina BE-18591	21%
				NRPS	informatipeptina	42%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%
<i>Streptomyces tuiurus</i>	JCM4 255	SD	23	T2PKS	pigmento de esporas	83%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%
				ectoína	ectoína	100%
				lantipéptido-clase-v	pristinina A3	23%
				T2PKS	colinomicina	96%
				NRPS	celichelín	100%
				T3PKS	7-prenilistatina	50%
	ATCC 12236	Industrial	32	NRPS, similar a NRPS	polioxipeptina	10%



<i>Streptomyces hawaiiensis</i>				T1PKS, similar a NRPS	nistatina A1	31%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS	vazabitida A	26%
				T2PKS	gilvocarcina V	88%
				NRPS	acildepsipéptido 1	78%
				NRPS	celichelín	100%
				T1PKS, similar a NRPS	tiotetroamida	64%
				lantipéptido-clase-iii	informatipeptina	100%
				T1PKS	maitansina/ansacitocina P-3	7%
				T3PKS	clipibicyclene	13%
<i>Streptomyces chartreusis</i>	ATCC 14922	SD	35	lantipéptido-clase-iii	laberintopeptina A2/laberintopeptina A1/laberintopeptina A3	40%
				T3PKS, NRPS	misaugamicina A/misaugamicina B	52%
				NRPS, T1PKS	prunipeptina	100%

				lantipéptido-clase-iii	informatipeptina	100%
				T2PKS	kosinostatina	21%
				T1PKS	polieno de Pseudonocardia similar a la nistatina	39%
				NRPS	estenotricina	13%
				T1PKS	camporidina A/camporidina B	50%
				T2PKS	pigmento de esporas	75%
				NRPS	arginomicina	20%
				NRPS	isigamida	100%
				T2PKS	mayamicina	77%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS, NRPS	celichelín	100%
				Similar a NRPS, T1PKS	salinomicina	10%
<i>Streptomyces fradiae</i>	ATCC 10745 = DSM 40063	SD	29	similar a PKS	validamicina A	13%
				similar a NRPS	desoxihangtamicina	4%
				lantipéptido-clase-i	acaeólido	12%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	dechlorocuramicina	20%
				T1PKS, similar a NRPS	bicomina	20%
				similar a NRPS	salinomicina	6%
				NRPS	clipibicyclene /azabicyclene	22%

					B/azabicyclic ne C/azabicyclic ne D	
				lantipéptido-clase-ii, NRPS	ácido-a- naflociclinoic o/fogacina	7%
				similar a NRPS, T3PKS	diastafenazin a/izumifenazi na	30%
				similar a NRPS, NRPS	bonnevillami da D/bonevillami da E	26%
<i>Streptomyces parvulus</i>	2297	SD	19	NRPS	actinomicina D	82%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	66%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				NRPS	celichelín	90%
				T3PKS	germicidina	100%
<i>Streptomyces tendae</i>	139	SD	15	ectoína	ectoína	100%
				Tipo PKS, T1PKS	nataxazol	66%
				lantipéptido-clase-i	diazaquinomi cina H/diazaquino micina J	4%
				NRPS	antimicina	100%
				lantipéptido-clase-iii	SAL-2242	77%
				T3PKS	alquilresorcín ol	100%

				T2PKS	pigmento de esporas	83%
<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	BTU6	Agrícola	24	NRPS	himastatina	36%
				T1PKS	primicina	8%
				T2PKS	julicromo Q3-3/julicromo Q3-5	64%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	83%
				T1PKS, similar a NRPS	microansamicina	66%
				NRPS	atraticmicina	34%
				T1PKS	metilnomicina	19%
				T2PKS	ácido-anaflociclinoico/fogacina	59%
				lantipéptido-clase-iii	informatipeptina	100%
				T1PKS	acaeólido	32%
				NRPS	enteromicina	12%
<i>Streptomyces vinaceus</i>	ATCC 27476	SD	24	lantipéptido-clase-iv	acramicina	5%
				T1PKS	hexacosalactona A	6%
				T3PKS	alquilresorcinol	100%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%

				NRPS, lantipéptido-clase-i, lantipéptido-clase-ii	jagaricina	13%
				NRPS	depsibosamicina B/depsibosamicina C/depsibosamicina D	14%
				NRPS, similar a NRPS	lipopéptido 8D1-1/lipopéptido 8D1-2	4%
				Similar a NRPS, T1PKS	miharamicina B/miharamicina A	89%
<i>Streptomyces olivaceus</i>	SCSI O T05	SD	35	T1PKS	Tautomicitina	19%
				NRPS	celichelín	100%
				NRPS	cada lado A/cada lado B	19%
				T1PKS, lantipéptido-clase-i	olimicina A/olimicina B	97%
				NRPS, similar a PKS	mirubactina	78%
				NRPS	esperanza	100%
				NRPS	nogalamicina	40%
				similar a PKS	micemicina C/micemicina A/micemicina B	91%

				NRPS	antibiótico diisonitrilo SF2768	55%
				lantipéptido-clase-i	tobramicina	16%
				NRPS, T1PKS	xiamicina A	72%
				NRPS, T2PKS, similar a PKS	rishirilida B/rishirilida A	100%
				lantipéptido-clase-ii	Savia B	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	66%
				NRPS	isigamida	50%
				lantipéptido-clase-ii	birimositida	87%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	detoxina P1/detoxina P2/detoxina P3	75%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%
				T3PKS	germicidina	100%
				T1PKS, NRPS, T3PKS, similar a NRPS	loboforina A	93%
<i>Streptomyces atratus</i>	SCSI O_ZH 16	SD	25	NRPS	enduracidina	14%
				Similar a NRPS, similar a PKS	bonnevillami da D/bonevillami da E	16%
				T2PKS	pigmento de esporas	83%

				Similar a NRPS, T1PKS, NRPS	ilamicina B1/ilamicina B2/ilamicina C1/ilamicina C2/ilamicina D/ilamicina E1	90%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS	desulfocletra micina/cletra micina	12%
				T3PKS	vazabitida A	17%
				NRPS	atratumicina	94%
				NRPS, T1PKS	montamida A/capsimicin a/clifednamid a A/frontalamid a A/combamid a A	55%
				T1PKS, NRPS,	bombixamici na A/bombixami cina B	51%
				Similar a NRPS	raimonol	90%
				NRPS	bonnevillami da D/bonevillami da E	13%
				NRPS, lantipéptido- clase-ii	omnipeptina	9%

				T1PKS	esporolida A/esporolida B	8%
				NRPS	cada lado A/cada lado B	28%
<i>Streptomyces harbinensis</i>	NA02 264	Médico	20	NRPS	desoxihangta imicina	20%
				NRPS, similar a NRPS	ohmyungsam ycin A/ohmyungs amycin B	100%
				T1PKS	butirolactol	26%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	omnipeptina	4%
				NRPS	antibiótico diisonitrilo SF2768	33%
				NRPS, T1PKS	ikarugamicin a	60%
				NRPS	coelibactina	81%
				T1PKS, NRPS, T2PKS	baikalomicina B/baikalomici na A/baikalomici na C	87%
				T3PKS	naringenina	100%
<i>Streptomyces cinereoruber</i>	ATCC 19740	SD	23	NRPS	cada lado A/cada lado B	19%
				ectoína	ectoína	100%
				NRPS	peucechelín	55%



				T2PKS	pigmento de esporas	83%
				T1PKS	neoabisomicina/abisomicina	56%
				NRPS, T1PKS	megapolibactina Acyc/megapolibactina Bcyc/megapolibactina C/megapolibactina D/megapolibactina E/megapolibactina F	15%
				NRPS	isigamida	50%
				NRPS	clipibicyclene/azabicyclene B/azabicyclene C/azabicyclene D	22%
				T2PKS, similar a NRPS	citrodina	82%
				NRPS	lisocina	14%
				ectoína	ectoína	100%
<i>Streptomyces venezuelae</i>	ATCC 107120	SD	30	T1PKS, similar a NRPS, T3PKS, NRPS	tiazostatina/watasemicina A/watasemicina B/2-hidroxifeniltiazolina	100%

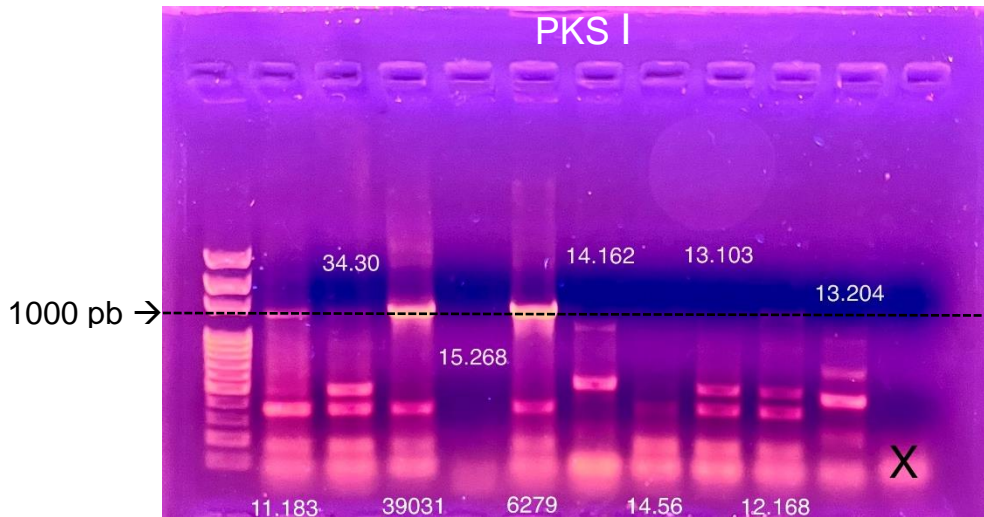
					enantioqu elina/isopioq uelina	
				lantipéptido-clase-ii	crisomicina	5%
				lantipéptido-clase-iv	venezuela	100%
				similar a NRPS	cloranfenicol	100%
				similar a NRPS	lactonamicina	10%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8- tetrahidroxina ftaleno	66%
				T2PKS	auricina	55%
				NRPS, similar a NRPS	colibrimicina	53%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	83%
				NRPS	peucechelín	55%
				T3PKS	alquilresorcín ol	100%
<i>Streptomyces lividans</i>	TK24	Industrial	26	NRPS, T3PKS	coelibactina	100%
				T3PKS	germicidina	100%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				NRPS	nogalamicina	40%
				T1PKS	coelimicina P1	100%
				T1PKS, similar a NRPS	undecilprodig iosina	100%
				T2PKS	pigmento de esporas	66%
				T2PKS	actinorrodina	100%

				NRPS	CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b	87%
				ectoína	ectoína	100%
				T3PKS	flaviolina/1, 3, 6, 8-tetrahidroxina ftaleno	100%
				NRPS	celichelín	100%
				lantipéptido-clase-i	loboforina CR4	5%
				T1PKS	leinamicina	2%
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	S21	SD	32	NRPS	griseobactina	100%
				T3PKS	naringenina	100%
				similar a NRPS	bombixamicina A/bombixamicina B	7%
				ectoína	ectoína	100%
				T2PKS	griseorhodina A	100%
				similar a NRPS	enduracidina	8%
				ectoína	showdomicina	47%
				NRPS	rubradirina	8%
				lantipéptido-clase-iii	AmfS	100%
				NRPS	clipibicyclene /azabicyclene B/azabicyclene	22%

					C/azabicyclic D	
				NRPS	mitomicina	18%
				Similar a NRPS	o-dialquilbence no 1/o-dialquilbence no 2	70%
				NRPS, T1PKS	viomcina	100%
				T3PKS, NRPS	CDA1b/CDA2a/CDA2b/CDA3a/CDA3b/CDA4a/CDA4b	7%
				T1PKS, NRPS	A-47934	11%
<i>Streptomyces pactum</i>	ACT12	Organismo modelo	29	NRPS, T2PKS, similar a NRPS	lomaiviticin A/lomaiviticin C/lomaiviticin D/lomaiviticin E	66%
				T1PKS, NRPS, lantipeptido-clase-v	celichelín	100%
				T1PKS, NRPS, similar a PKS	neocarzilina A/neocarzilina B	57%
				transAT-PKS, NRPS, similar a NRPS	intomicina B	90%
				T1PKS, NRPS	meilingicina	3%
				T1PKS, NRPS	BE-43547A1/BE-43547A2/BE-43547AB1/B	15%

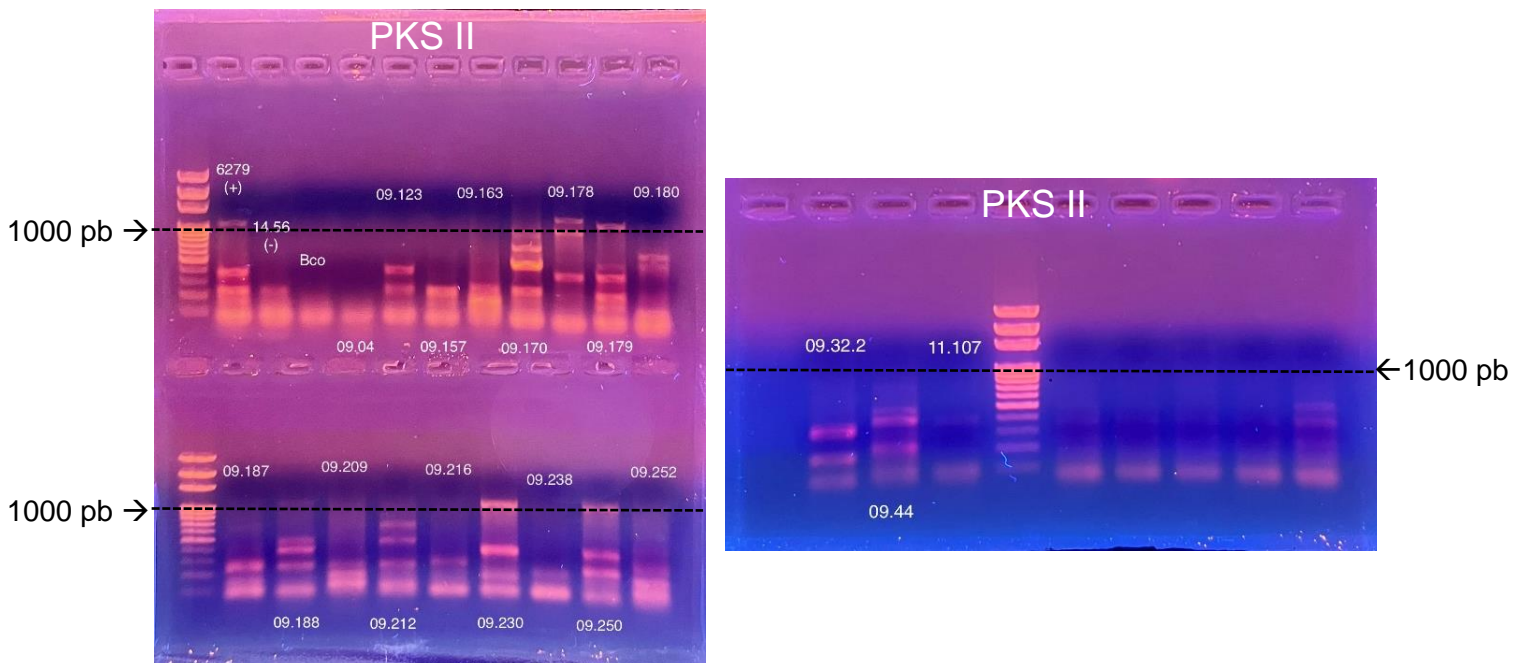
					E-43547AB2/B E-43547AB3/B E-43547AC1/B E-43547AC2	
				T1PKS, T2PKS	oligomicina	83%
				T3PKS	naftomicina A	9%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS, similar a NRPS	candicidina	95%
				T1PKS	lactonamicina	8%
				T2PKS, similar a NRPS, NRPS	lomaiviticina A/lomaiviticina C/lomaiviticina D/lomaiviticina E	74%
<i>Streptomyces viridosporus</i>	ATCC 39115	SD	24	Similar a NRPS, T1PKS	clorotricina/d esclorotricina	13%
				T3PKS, similar a NRPS	guadinomina/guadinomina B/ácido guadinómico	7%
				lantipéptido-clase-iii	Savia B	100%
				lantipéptido-clase-i, lantipéptido-clase-ii, NRPS	pigmento de esporas	66%
				ectoína	ectoína	100%
				T1PKS	enduracidina	29%
				NRPS	cinapeptina	100%
				NRPS	glicinocina A	20%

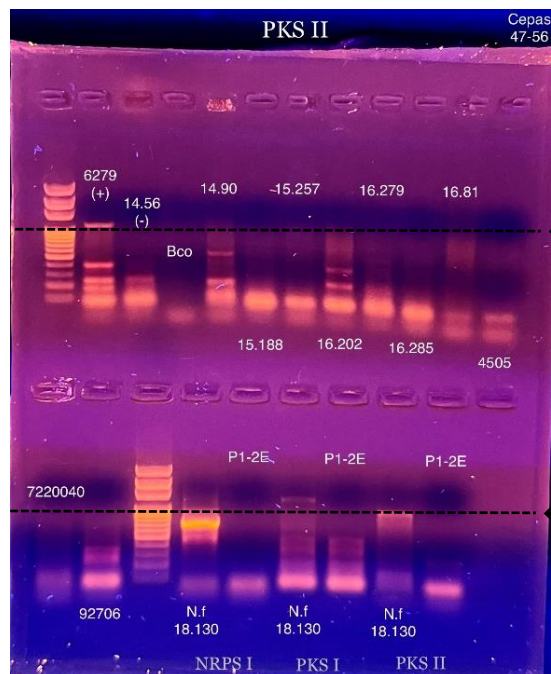
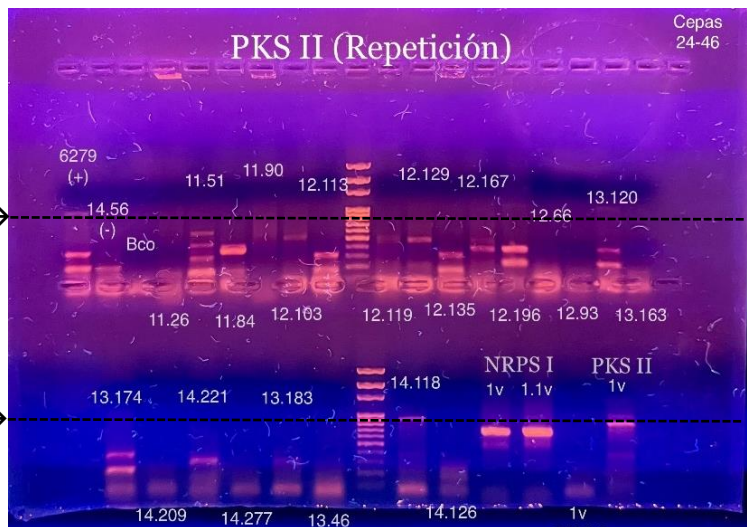
**Anexo B.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización e identificación de resultados de amplificación del sistema PKS I de las cepas de estudio.



Gel de agarosa 1.5% 100 V 60mA 35 min  
Observar a 1100-1200 pb

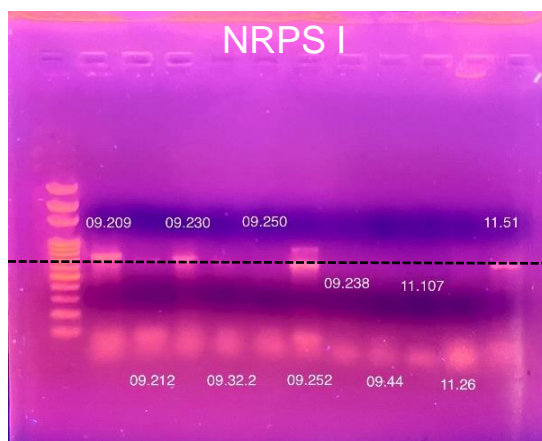
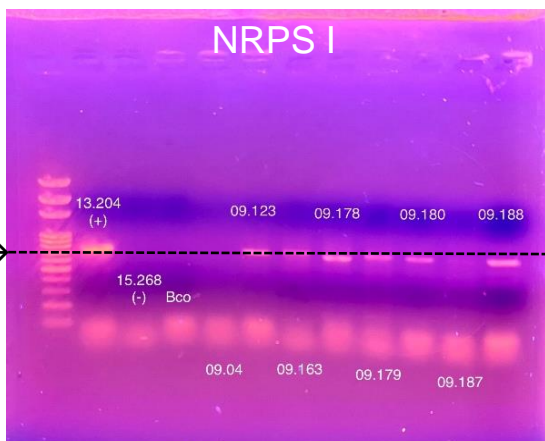
**Anexo C.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización e identificación de resultados de amplificación del sistema PKS II de las cepas de estudio.

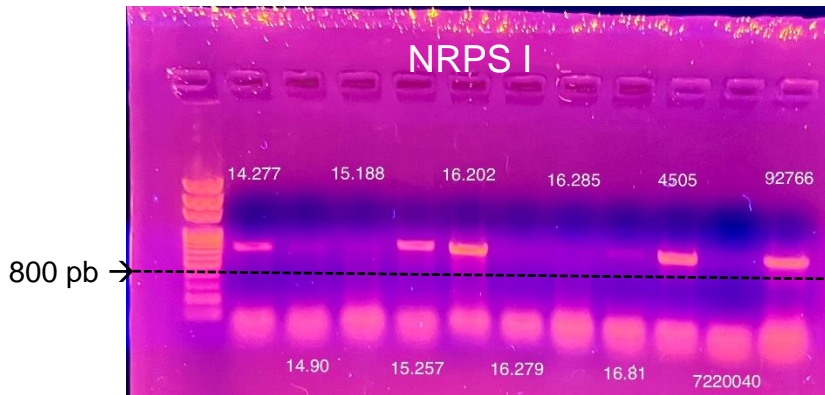
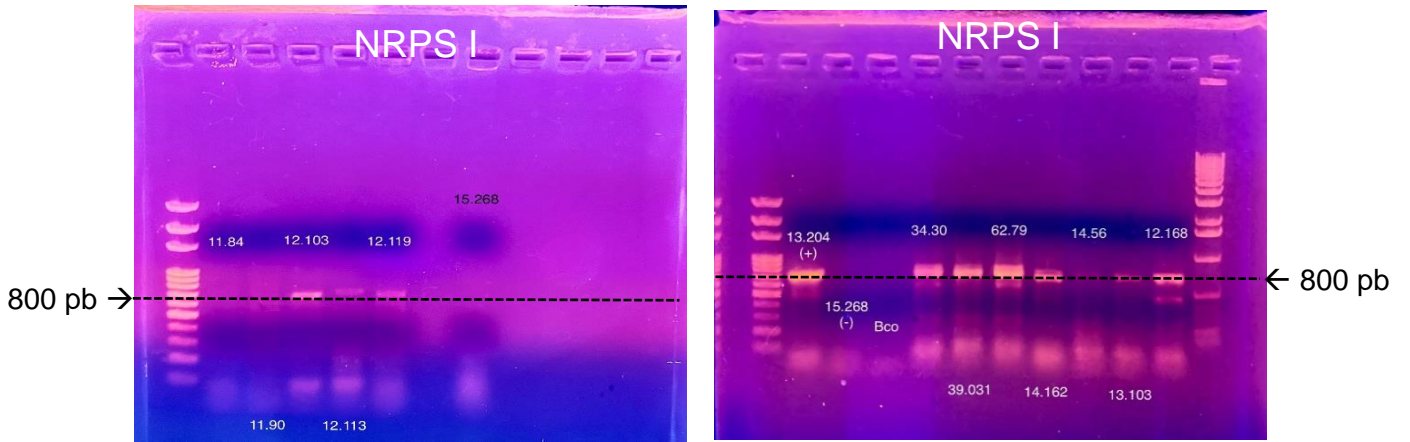




Gel de agarosa 1.5% 100 V 60mA 35 min  
 Observar a 1000 pb

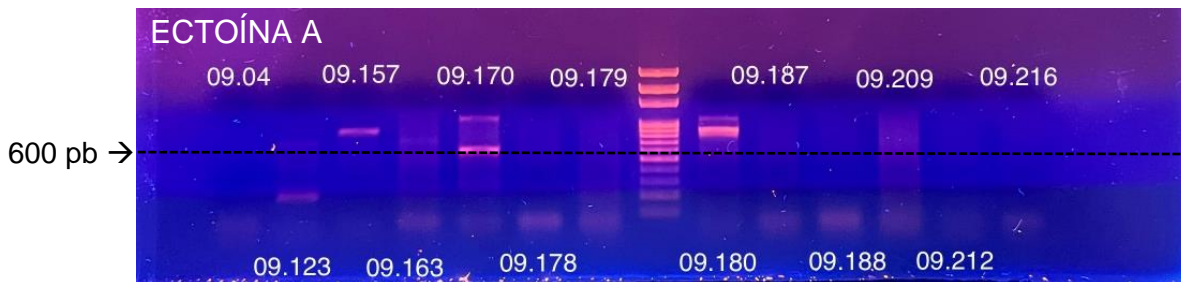
**Anexo D.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización e identificación de resultados de amplificación del sistema NRPS I de las cepas de estudio.



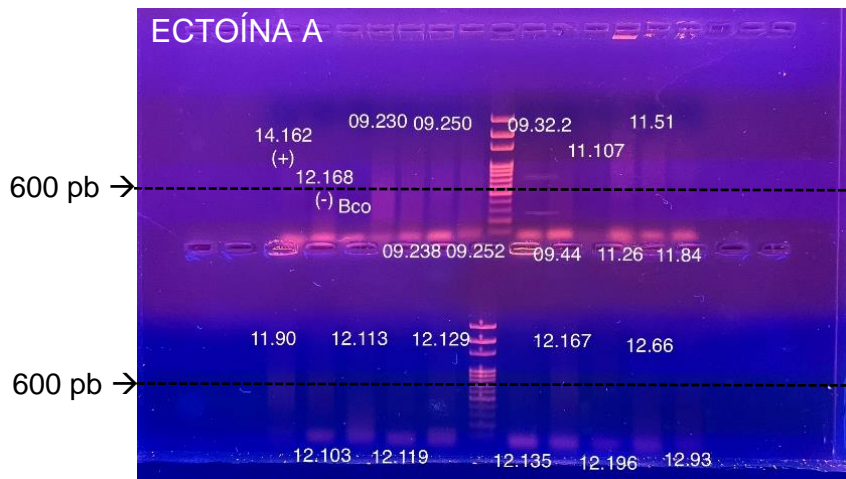


Gel de agarosa 1.5% 100 V 60mA 35 min  
 Observar a 700-800 pb

**Anexo E.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización e identificación de resultados de amplificación del sistema Ectoína A de las cepas de estudio.

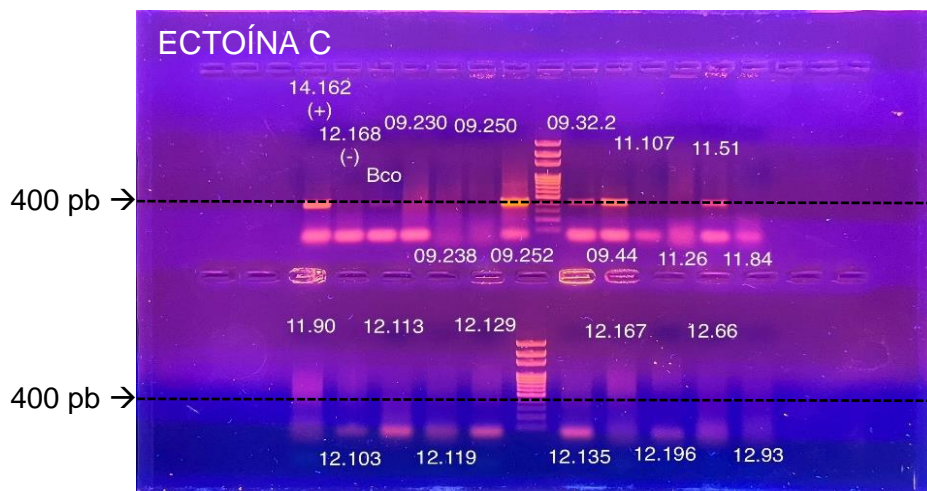
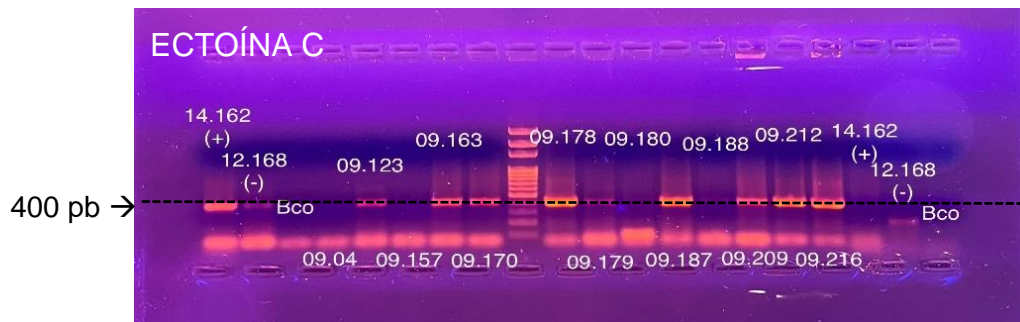


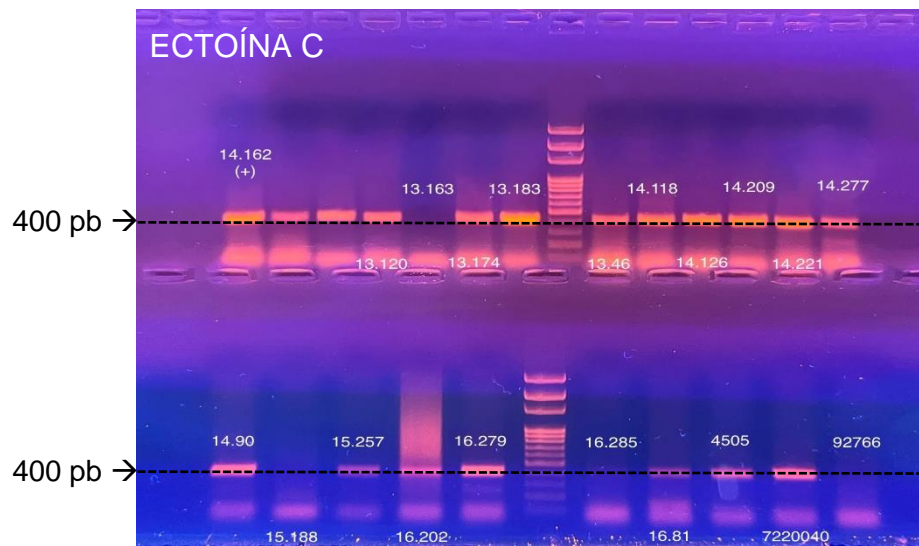




Gel de agarosa 1.5% 100 V 60mA 35 min  
Observar a 633 pb

**Anexo F.** Electroforesis en gel de agarosa para la estandarización e identificación de resultados de amplificación del sistema Ectoína C de las cepas de estudio.





Gel de agarosa 1.5% 100 V 60mA 35 min  
Observar a 414 pb

**10. Firma de asesores**

**Vo. Bo. del (la) o los (las) asesores (as) respecto a los contenidos académicos**



QFB. Nora Lidia Sánchez Saucedo

Nombre y firma del asesor interno  
Laboratorio de Producción de Biológicos.  
Número económico: 18752



Dra. Janette B. González Nava

Nombre y firma del asesor externo  
Laboratorio de Microbiología Médica y Ambiental, UAEMex  
Cédula no. 12744827